



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCE PHA POMOCÍ
CUPRIAVIDUS MALAYSIENSIS**

BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF PHA EMPLOYING CUPRIAVIDUS MALAYSIENSIS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Kateřina Drábková

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2019

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1266/2018
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Kateřina Drábková**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**
Akademický rok: 2018/19

Název diplomové práce:

Biotechnologická produkce PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis*

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Základní metabolická charakterizace použitých produkčních kmenů
3. Studium produkce PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis*
4. Základní charakterizace připravených polymerů

Termín odevzdání diplomové práce: 10.5.2019

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí diplomové práce.

Bc. Kateřina Drábková
student(ka)

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 31.1.2019

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Předmětem této práce je studium produkce polyhydroxyalkanoátů (PHA) pomocí *Cupriavidus malaysiensis*. Cílem této práce je získat a charakterizovat polymer, s co nejvýhodnějšími vlastnostmi. Teoretická část se nejdříve zabývá polyhydroxyalkanoáty a jejich biotechnologickou produkcí. Poté vybranými mikroorganismy produkujícími kopolymer 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu, P(3HB-co-4HB). Následně se teoretická část zabývá produkcí PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis*. V experimentální části byly využity bakteriální kmeny *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, 19379 a 25816. Kmen *Cupriavidus necator* H16 byl použit jako kmen kontrolní. Nejdříve byla stanovena schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku. Poté bylo cílem vybrat optimální zdroj uhlíku, prekurzor syntézy polymeru s vysokým podílem 4-hydroxybutyrátu a určit ideální kultivační podmínky pro růst studovaných mikroorganismů a produkci P(3HB-co-4HB). Byla provedena také dvoustupňová kultivace i kultivace v bioreaktoru za účelem produkce kýženého kopolymeru. Dále byla studována produkce terpolymeru 3-hydroxybutyrátu, 4-hydroxybutyrátu a 3-hydroxyvalerátu, P(3HB-co-4HB-co-3HV), jak jednostupňovou, tak dvoustupňovou kultivací. V poslední části byly charakterizovány produkované polymery pomocí plynové chromatografie (GC-FID), vylučovací chromatografie s detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech (SEC-MALS), diferenciální skenovací kalorimetrie (DSC) a termogravimetrie.

ABSTRACT

The subject of this diploma thesis is the study of the production of polyhydroxyalkanoates (PHA) employing *Cupriavidus malaysiensis*. The aim of this thesis is to obtain and characterize the polymer with the most advantageous properties. The theoretical part deals with polyhydroxyalkanoates and their biotechnological production. Then selected microorganisms producing 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate, P(3HB-co-4HB), are described. After that, the theoretical part deals with the production of PHA employing *Cupriavidus malaysiensis*. The bacterial strains of *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, 19379 and 25816 were used in the experimental part. The strain *Cupriavidus necator* H16 was used as a control strain. First, the ability to utilize various carbon sources by the given bacterial strains was determined. Then, the aim was to select the optimal carbon source, a precursor for the synthesis of a polymer with high content of 4-hydroxybutyrate, and to determine the ideal culturing conditions for the growth of the microorganisms, which have been studied, and the production of P(3HB-co-4HB). A two-stage culture and bioreactor culture was also performed to produce the desired copolymer. Furthermore, the production of terpolymer of 3-hydroxybutyrate, 4-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate, P(3HB-co-4HB-co-3HV), was studied by single-stage and two-stage cultivation. In the last part, the produced polymers were characterized by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID), size exclusion chromatography with multi-angle static light scattering (SEC-MALS), differential scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry.

KLÍČOVÁ SLOVA

Cupriavidus malaysiensis, P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-4HB-co-3HV)

KEYWORDS

Cupriavidus malaysiensis, P(3HB-co-4HB), P(3HB-co-4HB-co-3HV)

DRÁBKOVÁ, Kateřina. *Biotechnologická produkce PHA pomocí Cupriavidus malaysiensis*. Brno, 2019. Dostupné také z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zav-prace/detail/113527> Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....

podpis studentky

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce doc. Ing. Stanislavu Obručovi Ph.D. za jeho odborné vedení, připomínky a cenné rady při zpracování teoretické i experimentální části. Velký dík patří konzultantovi mé diplomové práce Ing. Danu Kučerovi za pomoc při práci v laboratoři a zpracování diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat všem, kteří se podíleli na zpracování mé experimentální části.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část	8
2.1	Polyhydroxyalkanoáty	8
2.1.1	Struktura.....	9
2.1.2	Klasifikace polyhydroxyalkanoátů	9
2.1.3	Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů	10
2.1.4	Aplikace polyhydroxyalkanoátů	11
2.2	Produkce polyhydroxyalkanoátů mikroorganismy	13
2.2.1	Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů	14
2.2.2	Biodegradace polyhydroxyalkanoátů.....	17
2.2.3	Vybrané mikroorganismy produkující poly(3HB-co-4HB).....	18
2.3	Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí <i>Cupriavidus malaysiensis</i>	21
2.3.1	Charakterizace jednotlivých kmenů.....	21
2.3.2	Produkce P(3HB-co-4HB)	22
3	Experimentální část.....	24
3.1	Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje	24
3.1.1	Použité mikroorganismy	24
3.1.2	Použité chemikálie	24
3.1.3	Použité přístroje	24
3.2	Kultivace bakterií.....	25
3.2.1	Oživení bakteriálních kultur a jejich uchovávání	25
3.2.2	Příprava inokula	25
3.2.3	Kultivace bakterií za účelem produkce PHA.....	26
3.3	Kultivace a produkce PHA v bioreaktoru.....	28
3.4	Stanovení schopnosti utilizace různých zdrojů uhlíku	28
3.5	Studium vlivu kultivačních parametrů na produkci biomasy a PHA	29
3.5.1	Studium vlivu přítomnosti kyslíku.....	29
3.5.2	Studium vlivu osmotické síly.....	29
3.6	Stanovení biomasy gravimetrickou metodou	29
3.7	Stanovení obsahu a složení PHA v biomase.....	30
3.7.1	Stanovení kalibrační přímky	30
3.7.2	Příprava vzorků na plynovou chromatografii	30

3.8	Izolace pHA a jeho další charakterizace.....	31
3.8.1	Izolace polymeru.....	31
3.8.2	Vylučovací chromatografie s detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech	31
3.8.3	Diferenciální skenovací kalorimetrie	31
3.8.4	Termogravimetrická analýza	31
4	Výsledky a diskuze	32
4.1	Schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku.....	32
4.2	Výběr optimálního zdroje uhlíku.....	34
4.2.1	Fruktosa, glukosa, γ -butyrolakton.....	34
4.2.2	Využití dalších prekurzorů 4HB – 1,4-butandiolu, 1,6-hexandiolu a ϵ -kaprolaktonu	37
4.2.3	Využití oleje jako substrátu pro produkci PHA	40
4.3	Studium vlivu kultivačních parametrů na produkci PHA.....	42
4.3.1	Vliv obsahu kyslíku na produkci biomasy a PHA	42
4.3.2	Vliv osmotické síly na produkci biomasy a PHA	45
4.4	Kultivace a produkce PHA s využitím bioreaktoru	47
4.5	Dvoustupňová kultivace za účelem produkce P(3HB- <i>co</i> -4HB).....	50
4.6	Produkce terpolymeru P(3HB- <i>co</i> -4HB- <i>co</i> -3HV)	52
4.6.1	Produkce za využití 1,4-butandiolu a γ -butyrolaktonu v kombinaci s kyselinou valerovou či propionátem sodným	52
4.6.2	Dvoustupňová kultivace za účelem produkce terpolymeru	55
4.7	Charakterizace izolovaných polymerů	57
4.7.1	SEC-MALS.....	57
4.7.2	Termické analýzy.....	60
5	Závěr	63
6	Použité zdroje.....	66

1 ÚVOD

Plasty získané z ropného průmyslu i přes své nepochybně výhodné vlastnosti a hojné využití trápí nejen ekology po celém světě kvůli jejich akumulaci v životním prostředí. Nejsou totiž v přírodě rozložitelné. Hromadění plastů má negativní dopad na celou biosféru. Tento celosvětový problém se snaží vyřešit celá řada vědců. Důležité je najít způsob, jak odstranit již produkované plasty z určitého ekosystému, jejich další recyklace, zpracování, či způsob jejich účinné degradace. I proto roste snaha vědců objevit nový materiál, který by byl zcela rozložitelný a díky svým vlastnostem schopný plně nahradit běžné plasty. Tak by klesla i jejich produkce.

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) představují slibný materiál s vlastnostmi velmi podobnými běžnému plastu. Jedná se o polyestery hydroxyalkanových kyselin. K jejich nejvýhodnějším vlastnostem patří biodegradabilita i biokompatibilita. PHA lze produkovat jak synteticky, tak biotechnologickou cestou. Možným východiskem tedy je produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí mikroorganismů. Zejména bakterie jsou schopny produkce různých typů polyhydroxyalkanoátů v závislosti na zdroji uhlíku, specifitě PHA-syntázy nebo podmínkách kultivace. PHA jsou akumulovány uvnitř buněk ve formě granulí. Jsou produkovány obvykle ve stresových podmínkách, při limitaci určitým biogenním prvkem a zároveň za nadbytku zdroje uhlíku. V buňce slouží jako zdroj uhlíku i energie.

Dobře prostudovaná je již na příklad syntéza poly(3-hydroxybutyrátu), P(3HB), bakterií *Cupriavidus necator* H16. Nevýhodou P(3HB) je však vysoká křehkost a tuhost. To lze vyřešit tím, že k monomeru 3-hydroxybutyrátu bude přidán další monomer k tvorbě kopolymeru s výhodnějšími vlastnostmi. Takovým monomerem pro vylepšení vlastností může být 4-hydroxybutyrát (4HB). Včlenění monomeru 4HB vede nejen k vylepšení mechanických vlastností, ale také k vyšší biokompatibilitě a rychlejší degradaci. Změnou poměru obou složek lze získat polymery s širokou škálou vlastností. Mimo to je známo, že se 4-hydroxybutyrová kyselina nachází v extraktech srdce, svalů či ledvin. Poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát), P(3HB-co-4HB), tak může být využíván ve farmacii i pro medicínské aplikace.

Je již známá produkce poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) na příklad pomocí rekombinantní *Escherichia coli* či již zmiňované bakterie *Cupriavidus necator* H16. Obecně je produkován P(3HB-co-4HB) za využití prekurzorů, zdrojů uhlíku, jako je 4-hydroxybutyrová kyselina, 1,4-butandiol či γ -butyrolakton. Rekombinantní *Escherichia coli* však k syntéze kopolymeru stačí pouze glukosa jako zdroj uhlíku i jako prekurzor pro syntézu P(3HB-co-4HB). Nedávno byl objeven také nový bakteriální druh *Cupriavidus malaysiensis* schopný produkce kopolymeru P(3HB-co-4HB). Tato práce se zabývá produkcí zmíněného kopolymeru právě pomocí nově objeveného druhu, který byl izolován z malajského prostředí.

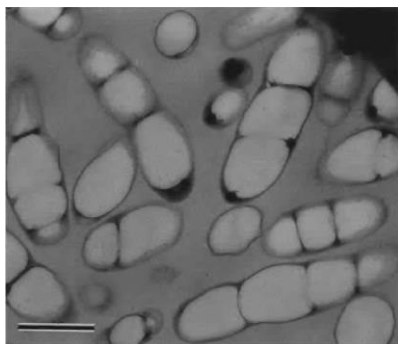
2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Polyhydroxyalkanoáty

Od padesátých let se syntetické plasty, plasty na bázi ropy, staly jedním z nejpotřebnějších materiálů v každodenním životě. Jsou využívány téměř v každém aspektu života od automobilů až po medicínu. Jejich bohaté využití je dáno jejich příznivými vlastnostmi, jako je chemická odolnost, stabilita, elasticita či tvárnost. Nicméně, navzdory užitečným vlastnostem, plasty na bázi ropy nejsou degradovatelné, což vede k rostoucím environmentálním problémům. Například ve světových oceánech se nachází asi 165 000 000 tun plastů. Navíc podle OSN jsou plasty zodpovědné za smrt milionů mořských ptáků, savců i želv ročně na celém světě. Zvyšující se environmentální hrozba tak vedla vědce ke studiu biologicky rozložitelných materiálů, které by plasty nahradily. K takovým alternativním materiálům patří například polylaktidy, polysacharidy či polyhydroxyalkanoáty [1, 2, 3].

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) jsou biomateriály s jedinečnými vlastnostmi, jako je biodegradabilita či biokompatibilita. Navíc jsou díky svým mechanickým a termoplastickým vlastnostem považovány za potenciální náhradu běžných nedegradovatelných petrochemických plastů. Důležité také je, že jsou jejich tepelné a mechanické vlastnosti regulovatelné a molekulová hmotnost je velmi rozmanitá, od několika desítek Daltonů až do několika milionů Daltonů. Vlastnosti jsou závislé na druhu mikroorganismu a příslušných PHA-syntáz. Vzhledem k rostoucím obavám spojeným s globálním znečištěním běžnými plasty z petrochemického průmyslu je věnována mnohem větší pozornost polyhydroxyalkanoátům. Tyto mikrobiální polymery šetrné k životnímu prostředí mají velký potenciál v biomedicínských, zemědělských a průmyslových aplikacích [4, 5, 6].

Polyhydroxyalkanoáty jsou biopolymery syntetizované prokaryotickými mikroorganismy uvnitř buněk ve formě granulí, lipidických inkluzí, jako zásobní zdroje uhlíku a energie. Zásobní granule jsou mikroorganismy obvykle tvořeny za přebytku zdroje uhlíku a zároveň omezení jiného biogenního prvku, například dusíku či fosforu. K takovým mikroorganismům patří *Pseudomonas putida* či *Cupriavidus necator*. Některé mikroorganismy syntetizují PHA během růstové fáze a nevyžadují žádné omezení živin. Sem patří rekombinantní *Escherichia coli*. K dnešnímu dni bylo objeveno více než 90 rodů gram pozitivních i gram negativních bakterií, které jsou schopny produkovat PHA, a to jak za aerobních, tak i anaerobních podmínek [4,7].

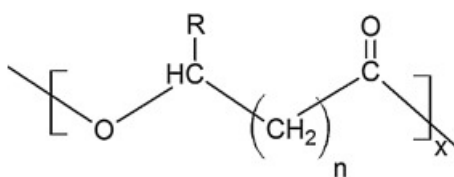


Obrázek 1: *Cupriavidus necator* akumulující PHA granule [3]

Polyhydroxyalkanoáty jsou přírodní polyestery 3-, 4-, 5-, a 6- hydroxyalkanových kyselin. Poprvé byly PHA pozorovány v roce 1888 Beijerinckem, ten však nedefinoval jejich roli a složení. Francouzský vědec Lemoigne jako první objevil v mikroorganismu *Bacillus megaterium* poly(3-hydroxybutyrát), PHB, v roce 1925 [4, 7].

2.1.1 Struktura

Polyhydroxyalkanoáty jsou lineární polyestery sestávající z monomerů hydroxyalkanových kyselin, které jsou spojeny esterovou vazbou. Tato vazba se tvoří spojením karboxylové skupiny jednoho monomeru s hydroxylovou skupinou sousedního monomeru. Obecná struktura PHA je znázorněna na obrázku níže. Pokud například $n=1$, $R=CH_3$, pak dostáváme strukturu poly(3-hydroxybutyrátu). Pokud $n=1$, $R=C_3H_7$, pak získáváme polymer s názvem polyhydroxyoktanoát. Dosud bylo objeveno přibližně 150 různých druhů PHA [4, 7].

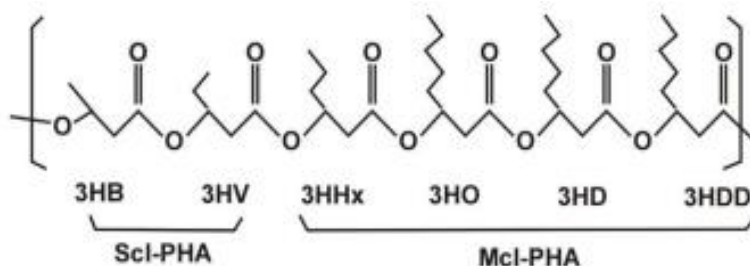


Obrázek 2: Obecná struktura polyhydroxyalkanoátů [4]

Identita monomerní jednotky PHA bývá určena typem postranního alkylového řetězce, R, který může být nasycený, nenasycený, rozvětvený či nerozvětvený. Může obsahovat i různé funkční skupiny. Počet opakujících se jednotek v řetězci závisí na příslušném postranním řetězci a na mikroorganismu, kterým je polymer produkován. Obvykle se monomerní jednotka opakuje 100krát až 30 000krát [1].

2.1.2 Klasifikace polyhydroxyalkanoátů

Polyhydroxyalkanoáty lze klasifikovat na základě počtu atomů uhlíku v monomerních jednotkách. Podle tohoto kritéria jsou rozděleny do tří tříd, a to na krátké (Scl), střední (Mcl) a dlouhé (Lcl). Scl-PHA mají 3 až 5 atomů uhlíku. Mcl-PHA obsahují ve svých monomerních jednotkách 5 až 14 atomů uhlíku a Lcl-PHA více než 14 atomů uhlíku, jsou ale méně časté a méně prostudované [4, 7, 8].



Obrázek 3: Rozdělení PHA podle délky řetězce [7]

Příklady Scl-PHA představují poly(3-hydroxybutyrát), poly(4-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxyvalerát). Řadí se sem i jejich kopolymery. Jsou syntetizovány širokým spektrem bakterií, jako je například *Cupriavidus necator*. K polyhydroxyalkanoátům se středně dlouhým řetězcem patří například poly(3-hydroxyhexanoát) či poly(3-hydroxyoktanoát). Jsou

shromažďovány převážně druhem *Pseudomonas*. Rozdíl mezi těmito dvěma třídami je dán zejména substrátovou specifikou PHA-syntáz, které mohou přijmout hydroxyalkanové kyseliny jen o určité délce uhlíkového řetězce. Například PHA-syntáza *C. necator* může polymerovat kyseliny s 3 až 5 atomy uhlíku, zatímco PHA-syntáza *Pseudomonas oleovorans* může akceptovat pouze kyseliny s 6 až 14 atomy uhlíku. Vzhledem ke stereospecifitě biosyntetických enzymů jsou všechny monomery v konfiguraci *R* [4, 9].

Další klasifikace rozděluje polyhydroxyalkanoáty na homopolymery a heteropolymery. Homopolymery obsahují pouze jeden typ monomerní jednotky, zatímco heteropolymery jsou složeny z více než jednoho typu monomerních jednotek. Heteropolymery bývají označovány také jako kopolymery. Jsou kombinací buď monomerů pouze Scl-PHA nebo jen Mcl-PHA, nebo sestávají z obou jednotek, jak Scl-PHA, tak Mcl-PHA [8].

2.1.3 Vlastnosti polyhydroxyalkanoátů

Mezi různými dobře známými biomateriály přitahují polyhydroxyalkanoáty značnou pozornost s ohledem na jejich jedinečné vlastnosti, díky kterým mohou být zpracovány jako biodegradabilní biomateriály. Biomateriál je považován za materiál určený k propojení s biologickým systémem pro diagnostiku, léčbu, posílení funkce či nahrazení jakékoli tkáně, orgánu nebo funkce těla. Biomateriály musí být snadno zpracovatelné a sterilovatelné. Musí být možná kontrola jejich stability a degradace v reakci na biologické podmínky. Bylo identifikováno přibližně 150 různých složek, ze kterých jsou tvořeny polyhydroxyalkanoáty. Ke stavebním kamenům polyhydroxyalkanoátů patří 3-hydroxybutyrát, 4-hydroxybutyrát, 3-hydroxyhexanoát a mnoho dalších. Pouze několik polymerů je však k dispozici v dostatečném množství pro výzkum aplikací. Patří sem například velmi zkoumaný poly(3-hydroxybutyrát), stejně jako poly(4-hydroxybutyrát), poly(3-hydroxyoktanoát), poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [10, 11].

Byly zkoumány různé rostlinné i bakteriální zdroje pro výrobu různých typů PHA. Typ produkovaného biopolymeru závisí jak na produkčním organismu a zdroji uhlíku, tak na specifitě PHA-polymerázy. Mechanické vlastnosti, biokompatibilita a rychlost degradace mohou být řízeny změnou složení PHA. Polyhydroxyalkanoáty se některými svými vlastnostmi podobají plastům. Většina PHA jsou termoplasty. Mohou být použity jako tuhé obalové materiály, ale i jako vysoce pružné elastomery a jsou zcela biologicky odbouratelné. Obecně se jedná o ve vodě nerozpustné materiály. Jsou rozpustné v chloroformu a chlorovaných organických rozpouštědlech. Vyznačují se dobrou odolností vůči UV záření. Teplota skelného přechodu se pohybuje v rozmezí od $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, teplota tání od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, v závislosti na složení polymeru. Chemické i fyzikální vlastnosti výsledných polymerů jsou ovlivňovány také funkcionalizací monomerů v řetězci [7, 10, 11].

2.1.3.1 Vlastnosti poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu)

Fyzikální vlastnosti polyhydroxyalkanoátů jsou zcela závislé na typu monomeru, který tvoří jejich řetězec. Poly(3-hydroxybutyrát), P(3HB), je biokompatibilní polymer, opticky čistý, mající piezoelektrické vlastnosti. Vykazuje dobrou odolnost vůči vlhkosti a má vynikající

bariérové vlastnosti pro plyny. Homopolymer P(3HB) je však vysoce krystalický, tuhý a křehký. To jej činí nevhodným pro různá využití, jako obalový materiál nebo pro biomedicínské aplikace. Kromě toho jsou si teplota tání a teplota tepelného rozkladu P(3HB) velmi podobné. Jeho nízká tepelná stabilita omezuje jeho využití v technikách s tepelným zpracováním. Fyzikální vlastnosti homopolymeru by mohly být zlepšeny produkcí polymeru s vyšší molekulovou hmotností. Takový polymer je produkován rekombinantní *Escherichia coli*, do které byl vnesen gen pro biosyntézu PHA z bakterie *Cupriavidus necator* [7, 11, 12].

Oproti tomu poly(4-hydroxybutyrát), P(4HB), má vlastnosti srovnatelné s polyetylenem s ultravysokou molekulovou hmotností. Je považován za vysoce elastický materiál, protože jeho pevnost v tahu je 104 MPa a prodloužení při přetržení je 1000 %. Pro srovnání, P(3HB) má pevnost v tahu pouze 40 MPa a prodloužení při přetržení 6 %. P(4HB) byl zkoumán pro použití v tkáňovém inženýrství pro náhradu srdeční chlopně. Úspěšně byl využit pro výrobu umělé srdeční chlopně u ovcí. Bostonská společnost Tephra Inc. získala souhlas FDA pro využití tohoto polymeru jako šicího materiálu v lékařství. K dnešnímu dni byly využity bakterie *Cupriavidus necator*, *Comamonas acidovorans* a *Hydrogenophaga pseudoflava* k produkci homopolymeru P(4HB) [10, 11, 13].

Zavedení sekundárních monomerů je obecnou strategií pro výrobu polymerů s lepšími vlastnostmi a dobrou zpracovatelností. Kopolymery polyhydroxyalkanoátů jsou méně krystalické, pružnější. Bylo zjištěno, že začlenění dalšího monomeru do řetězce poly(3-hydroxybutyrátu) vedlo k výraznému zlepšení vlastností výsledného kopolymeru. K takovým kopolymerům patří poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) nebo například poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) [10, 11].

Heteropolymer poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) [P(3HB-co-4HB)] patří mezi polyhydroxyalkanoáty s dobrými degradačními vlastnostmi a dobrou biokompatibilitou. Biokompatibilita tohoto kopolymeru je srovnatelná s poly(laktid-co-glykolidem), PLGA. Může být tedy použit jako matrice pro nosiče léčiv i v tkáňovém inženýrství. V kopolymerech P(3HB-co-4HB) obsah jednotek 4HB kolísá mezi 10,4 a 75,0 molárními procenty. Stupeň krystalinity kopolymeru se snižuje se zvýšením obsahu 4-hydroxybutyrátu. Účinek monomerních jednotek 4-hydroxybutyrátu na teplotní vlastnosti kopolymeru vykazuje snížení teploty tání, což zlepšuje vlastnosti kopolymeru spojené se zpracováním. Inkorporace monomerů 4HB do řetězce P(3HB) ovlivňuje také rozložitelnost polymeru. Heteropolymer je hydrolyzován nejen P(3HB)-depolymerázami, ale také lipázami. Přítomnost 4HB jednotek v kopolymeru zrychluje štěpení řetězců jednoduchou i enzymatickou hydrolýzou. Kopolymer se tedy vyznačuje velmi dobrou biologickou rozložitelností [13, 14, 15].

2.1.4 Aplikace polyhydroxyalkanoátů

Díky biokompatibilitě a biologické rozložitelnosti se polyhydroxyalkanoáty využívají v mnoha oblastech. Polyhydroxyalkanoáty jsou užitečným produktem biotechnologie. Jejich vlastnosti, jako molekulová hmotnost, krystalinita, mechanická pevnost či biologická odbouratelnost, jsou zcela závislé na monomerním složení, případně na podílu monomerních jednotek v řetězci. Mohou být využity jako biopaliva, obalové materiály, pro výrobu lékařských i farmaceutických

produktů. Vývoj nových materiálů patří mezi priority biotechnologií na globální úrovni. Zvláštní pozornost je kladena na vývoj a zkoumání materiálů pro medicínské aplikace [7, 14].

Biokompatibilita PHA v medicínských aplikacích je dobře známá. Většina výrobků vycházejících z polyhydroxyalkanoátů je směřována na kardiovaskulární aplikace. Počet pacientů s kardiovaskulárními nemocemi roste alarmujícím tempem, což je způsobeno zejména moderním životním stylem vyznačujícím se nepravidelnou stravou a nedostatečným pohybem. Při léčbě kardiovaskulárních onemocnění mohou být polyhydroxyalkanoáty využity jako náhrady srdečních chlopní nebo například pro výrobu náhradních vaskulárních štěpů. Polyhydroxyalkanoáty jsou také studovány jako potenciální materiály určené k léčbě ran (stehy, sponky a tak dále), materiály využitelné v ortopedii (scaffoldy pro tkáňové inženýrství chrupavek i kostí, regenerace menisku) a pro cílenou distribuci léčiv [7, 11].

2.1.4.1 Aplikace P(4HB) a P(3HB-co-4HB)

Monomery 3-hydroxybutyrátu se přirozeně nachází v lidském krevním oběhu. Monomery 4-hydroxybutyrátu se nachází v extraktech mozku, srdce, plic, jater i ledvin. Jelikož je P(3HB-co-4HB) znám také pro svou výbornou biokompatibilitu a kontrolovanou biologickou rozložitelnost, je považován za vynikající biomateriál využitelný v celé řadě medicínských aplikací [16].

Ve zdravotnické oblasti byl 4-hydroxybutyrát původně aplikován jako intravenózní anestetikum. Tato sloučenina totiž může rychle procházet krevní mozkovou bariérou a vyvolat spavost bez narušení kardiovaskulární stability. Následně byl 4HB používán k léčbě narkolepsie. Aplikace 4-hydroxybutyrátu byla také rozšířena v léčbě závislosti alkoholu, jelikož zvyšuje hladinu dopaminu v mozku. Studie také dokázaly, že 4-hydroxybutyrát je schopen chránit mozek a periferní tkáň před škodlivými účinky, které jsou způsobeny nadměrnou spotřebou látek, které slouží jako zásoba energie. Tato vysoká spotřeba může být způsobena například anoxií, případně vysokou metabolickou aktivitou organismu [11].

Jak již bylo zmíněno výše, polyhydroxyalkanoáty se využívají zejména pro kardiovaskulární aplikace. Poly(4-hydroxybutyrát) a poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) se využívají pro výrobu náhradních srdečních chlopní. Funkcí srdečních chlopní je indukce jednosměrného průtoku krve v oběhové soustavě. Onemocnění srdeční chlopně může být způsobeno vrozenou vadou, endokarditidou či revmatickou horečkou. Bylo navrženo několik metod léčby včetně výměny srdeční chlopně. Mechanické chlopně jsou vynikající z hlediska trvanlivosti. Pacienti však po implantaci musí podléhat celoživotní léčbě srážlivosti krve. Oproti tomu biologické chlopně nevyžadují antikoagulační léčbu, nemají však vhodnou pevnost a trvanlivost k podpoře tlaků vyvolaných srdcem. Musí být také chemicky modifikované, aby je tělo přijalo za vlastní. Současné studie tkáňového inženýrství hodnotily vhodnost polyglykolové kyseliny, PGA, jako biomateriálu pro výrobu scaffoldu plicní aorty u ovčího modelu. V rámci této studie byl studován P(4HB) jako potahový materiál. Bylo zjištěno, že potažený materiál byl stabilnější *in vitro* než nepotažený materiál. Echokardie ukázala, že implantace PGA/P(4HB) nevyvolala žádnou tvorbu trombů, nebyly prokázány žádné známky aneuryzmatu ani stenózy. Kompozice byla po 8 týdnech od implantace do mladých ovcí zcela degradována a nahrazena nativní tkání byla po 20 týdnech, nová srdeční chlopeň byla velmi podobná přirozené [11, 17].

Jako náhrada poškozených cév se používají vaskulární štěpy. V současnosti existují dva typy syntetických štěpů, které jsou široce využívány pro tuto aplikaci, Darcon a polytetrafluoretylen. Nelze je však využít pro krevní cévy s menším průměrem, protože se snadno uzavírají. Pro překonání tohoto problému roste snaha vyvinout nový materiál, který by mohl být použit i pro cévy s menším průměrem metodou tkáňového inženýrství. Kompozitní materiál PGA/P(4HB) byl nedávno studován jako potenciální cévní štěp. Tento materiál byl tvarován do trubicových scaffoldů s vnitřním průměrem 5 mm a délkou 4 cm. Byly do něj naočkovány ovčí cévní myofibroblasty a endotelové buňky. Osazené konstrukce byly inkubovány metodou statické kultivace po dobu 4 dnů. Poté byly podrobeny pulzním průtokovým podmínkám pro simulaci střížného napětí *in vivo* a radiálního roztažení stěny cév po dobu 4, 7, 14, 21 a 28 dní před provedením analýzy. Analýza ukázala, že došlo k pokročilé tvorbě tkáně organizovaným vrstveným způsobem s hladkým povrchem a buňkami orientovanými ve směru toku, zvláště po vystavení pulzním podmínkám po dobu 28 dní. Bylo spekulováno, že předčasné vystavení povrchu vysokému toku mohlo způsobit částečné oddělení endotelových buněk [11, 17].

Jak již bylo zmíněno, P(4HB) může být prodloužen téměř 10krát oproti své původní délce. Během procesu roztahování dochází k orientaci polymerů a k tvorbě mimořádně silných vláken. Tato vlákna jsou silnější než typická polypropylenová vlákna užívaná jako šicí materiál v lékařství. Jejich pevnost je srovnatelná s pevností komerčních vláken pro chirurgické šití, jako Maxon či PDS II. Nejnovějším přírůstkem k syntetickým absorbovatelným materiálům pro šití je TefhaFLEX, produkovaná firmou Tefha Inc, sestávající právě z poly(4-hydroxybutyrátu). Studie ukázaly, že TefhaFLEX je jak biokompatibilní, tak nezávadný. Jeho biodegradace nastává běžnými procesy a produkty rozkladu jsou tělu vlastní. Na rozdíl od ostatních vstřebatelných stehů na trhu se vyrábí převážně fermentačním způsobem. Poly(4-hydroxybutyrát) je přirozeně tvořen uvnitř buněk jako skladovací granule schopná regulovat energetický metabolismus, proto neobsahuje žádné zbytkové kovové katalyzátory, které by mohly vyvolat nežádoucí účinky, jako například zánět. Komerční produkce P(4HB) se provádí vlastním fermentačním procesem pomocí rekombinantní *Escherichia coli*. Použití fermentace je výhodné nejen díky vysokým výtěžkům, až 50 g/l, ale také proto, že umožňují další úpravu vlastností polymeru začleněním dalšího monomeru či změnou molekulové hmotnosti [17, 18].

Mimo to oligomery P(4HB) s nízkou molekulovou hmotností byly připraveny pro potenciální použití v aplikacích pro opravu měkkých tkání. Tyto oligomery byly připraveny hydrolýzou P(4HB) s vyšší molekulovou hmotností v roztoku. Potenciálně by mohly být aplikovány injekčně [17].

2.2 Produkce polyhydroxyalkanoátů mikroorganismy

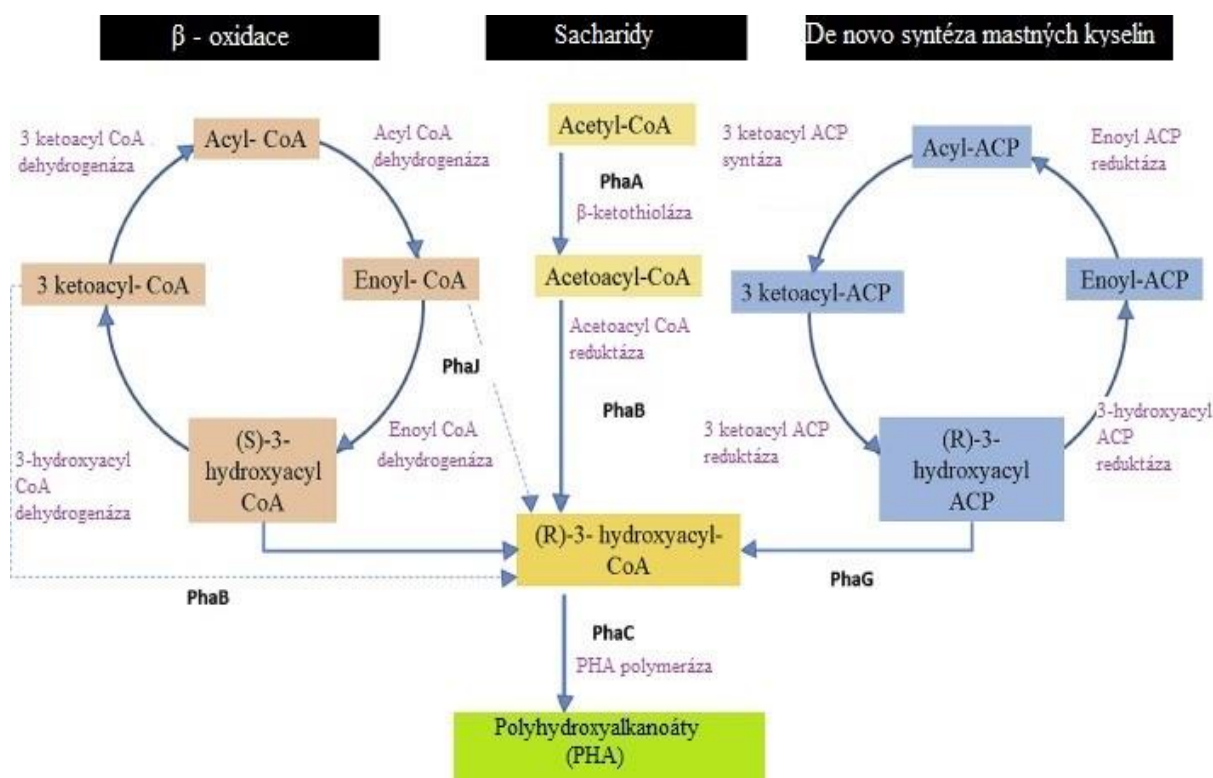
Mikrobiální syntéza polyhydroxyalkanoátů byla studována po mnoho let s nadějí, že by tyto biologicky rozložitelné materiály alespoň částečně nahradily nedegradovatelné plasty petrochemického průmyslu. Bylo dosaženo jen částečného úspěchu, proto je stále kladeno úsilí na zlepšení biosyntézy. Bakterie, které se používají k výrobě bioplastů, mohou být rozděleny do dvou skupin na základě kultivačních podmínek požadovaných pro syntézu

polyhydroxyalkanoátů. První skupina bakterií vyžaduje omezení určitým biogenním prvkem, jako je N, Mg, K, O či S, pro účinnou syntézu za současného přebytku zdroje uhlíku. Druhá skupina bakterií nevyžaduje omezení živin a může akumulovat PHA během svého růstu. Zatímco *Cupriavidus necator*, *Pseudomonas oleovorans* patří do první skupiny, rekombinantní *Escherichia coli* patří do skupiny druhé [19, 20].

K syntéze PHA u určitých druhů bakterií, jak bylo zmíněno výše, se využívá médium, ve kterém je nedostatek určitého biogenního prvku a zároveň nadbytek zdroje uhlíku. Byly vyvinuty dva různé přístupy kultivace. V jednostupňové kultivaci dochází k současnému růstu buněk i k akumulaci polyhydroxyalkanoátů. Zatímco dvoustupňová kultivace se skládá z fáze růstu buněk, která se provádí v živném médiu bohatém na živiny. Poté jsou buňky přeneseny do živného média s omezeným obsahem živin pro akumulaci PHA. Buňky prochází v průběhu kultivace sekvencí růstových fází, jako je klidová fáze, exponenciální fáze, stacionární fáze a konečná fáze odumírání. Polyhydroxyalkanoáty bývají syntetizovány ve fázi stacionární. Obecně biosyntéza PHA zahrnuje vychytávání a konverzi uhlíkových zdrojů na prekurzorové molekuly, které jsou následně polymerovány pomocí enzymu PHA-syntázy. Metabolická dráha biosyntézy polyhydroxyalkanoátů se liší podle rodu bakterie. Geneticky upravená dráha umožňuje syntézu polymeru požadovaného typu a složení [11, 16, 19].

2.2.1 Biosyntéza polyhydroxyalkanoátů

Tři nejznámější přirozeně se vyskytující cesty biosyntézy polyhydroxyalkanoátů jsou shrnuty schematicky na obrázku níže. Patří sem biosyntéza sacharidů, oxidace mastných kyselin a nově i cesta biosyntézy mastných kyselin. První cesta je pravděpodobně nejběžnější a byla nalezena u široké škály bakterií. Tato biosyntetická dráha byla podrobně zkoumána u bakterie *Cupriavidus necator*. Zde kondenzují dvě skupiny acetyl-CoA za vzniku acetoacetyl-koenzymu A za účinnosti 3-ketothiolasy, PhaA. Produkt je následně redukován na (R)-3HB-CoA pomocí acetoacetyl-CoA-reduktázy, PhaB. Polymerizační enzym, PhaC, odpovědný za polymerizaci řetězce je schopen přijímat pouze izomery v konformaci R. Přirozeně tak vznikají polymery pouze v této konformaci [5, 21].



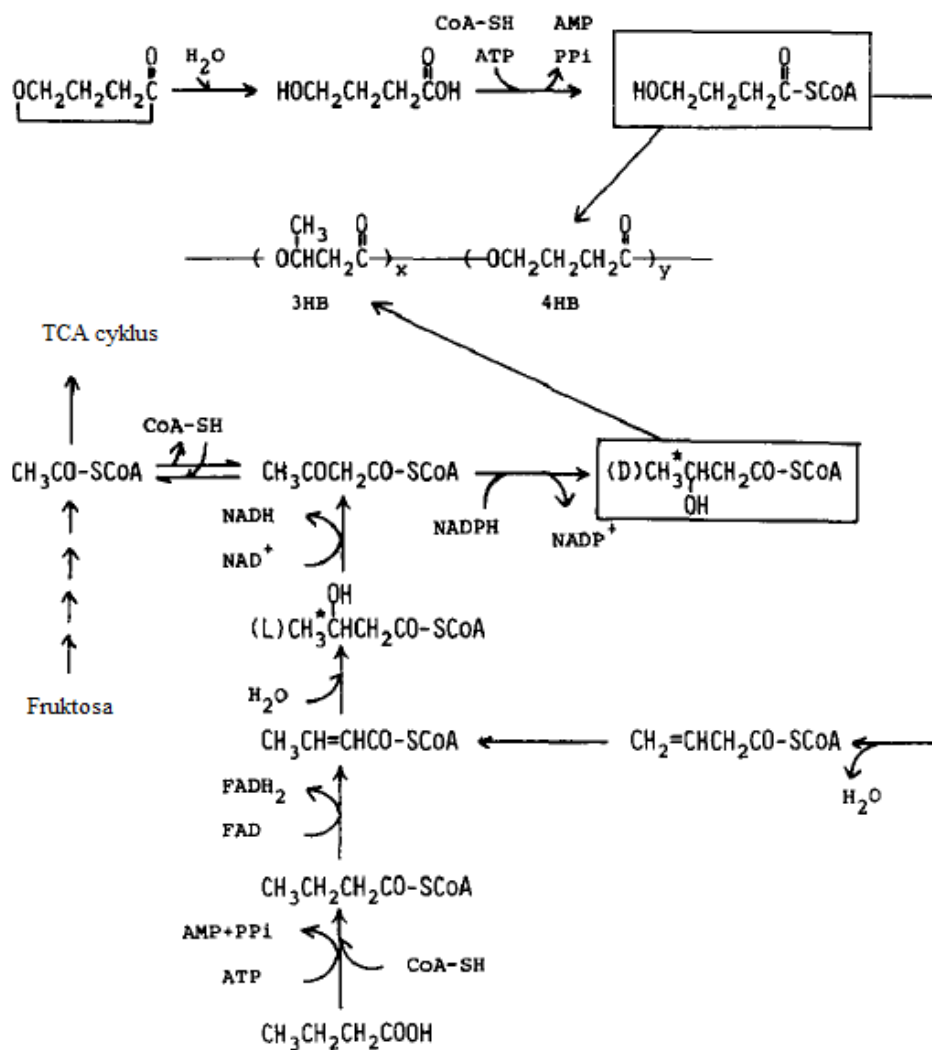
Obrázek 4: Schéma biosyntézy polyhydroxyalkanoátů [5]

Regulace biosyntézy polyhydroxyalkanoátů je složitá. Přebytek volného koenzymu A (CoA) inhibuje syntézu PHA, zatímco jeho snížené množství vede k aktivaci syntézy. Regulace syntézy zahrnuje různé environmentální, metabolické a genetické signály. Jsou známy další dva důležité proteiny v biosyntéze polyhydroxyalkanoátů, a to PhaZ a PhaP. Na katabolismu se podílí enzym PhaZ. Nedávné studie ukázaly, že degradace polyhydroxyalkanoátů je prováděna komplexním mechanismem, který vyžaduje několik depolymeráz (PhaZ1, PhaZ2 a PhaZ3) společně s dalšími doposud nezařazenými enzymy. Ve stabilizaci granulí PHA hraje roli protein PhaP. Jedná se o protein, který zvyšuje produkci polyhydroxyalkanoátů vazbou na jejich granule [22, 23].

2.2.1.1 Biosyntéza P(3HB-co-4HB)

Biosyntézy kopolymeru P(3HB-co-4HB) pomocí mikroorganismů lze dosáhnout třemi různými metodami, které jsou založené na použití vhodného zdroje uhlíku. První metoda používá směs dvou různých zdrojů uhlíku, jako je kyselina máselná a kyselina 4-hydroxymáselná. Druhá metoda využívá jediný zdroj uhlíku příbuzný 4-hydroxybutyrátu, jako je 4-hydroxymáselná kyselina, γ -butyrolakton nebo 1,4-butandiol. Třetí metoda je založena na využití rekombinantní *Escherichia coli*, viz kapitola 2.2.3.1. Bylo dokázáno, že tato bakterie je schopná kopolymer P(3HB-co-4HB) produkovat za použití glukózy jako jediného zdroje uhlíku. Ukázalo se, že nejvýhodnější metoda je ta, při které se používají dva zdroje uhlíku, protože lze produkovat P(3HB-co-4HB) s širokým rozsahem monomerních kompozic. V závislosti na poměru monomerních jednotek 3HB a 4HB může být kopolymer vysoce elastický nebo i tuhý krystalický plast. K používaným zdrojům uhlíku pro tvorbu 3-hydroxybutyrátu patří fruktóza, glukóza a kyselina máselná. Oproti tomu k tvorbě 4-hydroxybutyrátu se využívá

Obrázek 5 znázorňuje hypotetickou cestu biosyntézy P(3HB-co-4HB) u bakterie *Cupriavidus necator* H16. Pokud je jako jediný zdroj uhlíku použit γ -butyrolakton, v buňkách se nejdříve vytvoří 4-hydroxybutyryl-koenzym A. Část 4-hydroxybutyryl-CoA se poté metabolizuje na D-3-hydroxybutyryl-koenzym A prostřednictvím komplexní metabolické dráhy, o které se předpokládá, že se vyskytuje u *Clostridium kluyveri*. Náhodný kopolymer monomerních jednotek 3HB a 4HB je vyroben kopolymerací D-3-hydroxybutyryl-CoA s 4-hydroxybutyryl-CoA za působení polyhydroxybutyryl-polymerázy. Obsah frakce 4-hydroxybutyrátu v kopolymeru se zvyšuje s rostoucí koncentrací γ -butyrolaktonu v kultivačním médiu. Tento výsledek naznačuje, že podíl 4-hydroxybutyryl-CoA a D-3-hydroxybutyryl-CoA je ovlivněn koncentrací γ -butyrolaktonu. Při použití fruktózy jako zdroje uhlíku pro *Cupriavidus necator* H16 je D-3-hydroxybutyryl-koenzym A vyráběn z acetyl-koenzymu A přes acetoacetyl-koenzym A [25, 26].



16

Při použití kyseliny máselné v kombinaci s γ -butyrolaktonem byla v buňkách *C. necator* H16 syntetizována směs náhodných kopolymerů s různým obsahem frakcí 4HB. Kyselina máselná je známá metabolizací na D-3-hydroxybutyryl-koenzym A přes acetoacetyl-koenzym A v cyklu β -oxidace. Meziprodukt kyseliny máselné produkovaný v cyklu β -oxidace může v buňkách inhibovat transformaci 4-hydroxybutyryl-CoA na D-3-hydroxybutyryl-CoA, což vede ke vzniku kopolymeru s vysokým podílem 4HB [25].

2.2.2 Biodegradace polyhydroxyalkanoátů

Biodegradabilní polymery hydroxyalkanových kyselin jsou syntetizovány organismy za specifických podmínek. Fyziologické vlastnosti mikroorganismů produkujících PHA a podmínky růstu, jako je zdroj uhlíku, určují schopnost syntetizovat polyhydroxyalkanoáty různých chemických struktur s různým složením a rozdílným obsahem monomerních jednotek. Vzhledem k tomu, že se zvyšuje produkce PHA, je třeba se více zaměřit na studium degradace v životním prostředí [27].

Biodegradace je zprostředkována mikroorganismy, které sekretují vhodné depolymerázy. Depolymerázy se liší svou strukturou a substrátovou specifitou. Polyhydroxyalkanoáty mohou být degradovány jak v intracelulární formě, tak i uvolněné do prostředí. Extracelulární depolymerázy jsou produkovány mnoha bakteriemi i houbami. Intracelulární forma PHA je kvůli své amorfní struktuře degradována jinými depolymerázami než forma extracelulární. Intracelulární PHA-depolymerázy nejsou schopné hydrolyzovat extracelulární polyhydroxyalkanoáty a extracelulární depolymerázy nemohou štěpit intracelulární granule vzhledem k rozdílným fyzikálním strukturám obou forem. Nativní intracelulární granule jsou amorfní a jsou pokryty povrchovou vrstvou složenou z proteinů a fosfolipidů, zatímco denaturované extracelulární polyhydroxyalkanoáty jsou krystalické. Rozdíl je také v tom, že PHA-depolymerázy štěpící intracelulární granule jsou syntetizovány přímo mikroorganismy produkujícími polyhydroxyalkanoáty, kdežto extracelulární enzymy jsou produkovány i jinými mikroorganismy [28, 29].

Biodegradace PHA je komplexní vícestupňový proces, který je ovlivněn řadou faktorů, včetně chemického složení a vlastnostmi polyhydroxyalkanoátu, způsobu jeho výroby, ale také podmínkami okolního prostředí, druhem mikrobiální kultury, dostupností vody a mnoha dalšími parametry. Zdá se, že rozklad PHA probíhá ve dvou krocích. Nejprve jsou polyhydroxyalkanoáty rozloženy na monomery, dimery či směs oligomerů v závislosti na typu depolymeráz. Oligomery jsou poté dále štěpeny na monomery. V biologickém prostředí jsou dále degradovány za vzniku neškodných produktů. Za aerobních podmínek jsou produkty rozkladu oxid uhličitý a voda. Za anaerobních podmínek jsou degradovány za vzniku metanu a vody. Všechny doposud známé PHA-depolymerázy jsou specifické pro polymery sestávající z monomerů v *R* konfiguraci. Polymery v konfiguraci *S* připravené chemickou cestou tedy nemohou být degradovány pomocí PHA-depolymeráz [28, 29].

První mikroorganismy degradující PHA byly izolovány před více než 40 lety. Jednalo se o depolymerázy degradující poly(3-hydroxybutyrát). S tím, jak rostla rozmanitost PHA, rostla také snaha vědců izolovat a charakterizovat mikroorganismy zodpovědné za degradaci různých typů PHA. Zkoumána byla především degradace již zmíněného P(3HB), ale i kopolymeru

poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerátu). Existuje také řada studií o degradaci polyhydroxyalkanoátů s různými chemickými složkami, včetně degradace slibných elastomerních polymerů, jako je P(3HB-co-4HB). Ve studiích degradace polyhydroxyalkanoátů je největší pozornost věnována izolaci a charakterizaci mikroorganismů zapojených do tohoto procesu. Dosud bylo identifikováno asi 600 různých PHA-depolymeráz z rozličných mikroorganismů. Ve studiích byly popsány bakterie, aktinomycety i mikromycety, které rozkládají PHA v půdě, kompostu, aktivovaném kalu, říční a mořské vodě. I když jsou mikroorganismy zapojené do biodegradace PHA studovány více než 40 let, stále je potřeba pochopit mnoho aspektů tohoto komplexního procesu [29].

2.2.3 Vybrané mikroorganismy produkující poly(3HB-co-4HB)

Polyhydroxyalkanoáty jsou biodegradovatelné polyestery průmyslově vyráběné pomocí rekombinantní *Escherichia coli* nebo pomocí *Cupriavidus necator* H16. Nové studie uvádí také produkci polyhydroxyalkanoátů z metanu prostřednictvím *Methylocystis hirsuta*. Ačkoliv je poly(3-hydroxybutyrát) nejvíce studovaným polyhydroxyalkanoátem, není příliš využívaný vzhledem k jeho krystalické povaze. Začlenění jednotky 4-hydroxybutyrátu do řetězce poly(3-hydroxybutyrátu) vede ke vzniku náhodného kopolymeru P(3HB-co-4HB). V závislosti na podílu frakce monomerních jednotek 4HB mění kopolymer své vlastnosti od tvrdého krystalického až po elastický polymer. Vzhledem k jeho flexibilním mechanickým i fyzikálním vlastnostem je P(3HB-co-4HB) považován za jeden z nejlepších a nejslibnějších polyhydroxyalkanoátů a očekává se jeho široké využití v mnoha oblastech, jako jsou obalové fólie, nosiče léčiv či scaffoldy pro buněčné kultury. Nejvíce studovanými bakteriemi pro produkci tohoto významného heteropolymery jsou *Cupriavidus necator*, *Burkholderia sacchari* a rekombinantní *Escherichia coli* [10, 30].

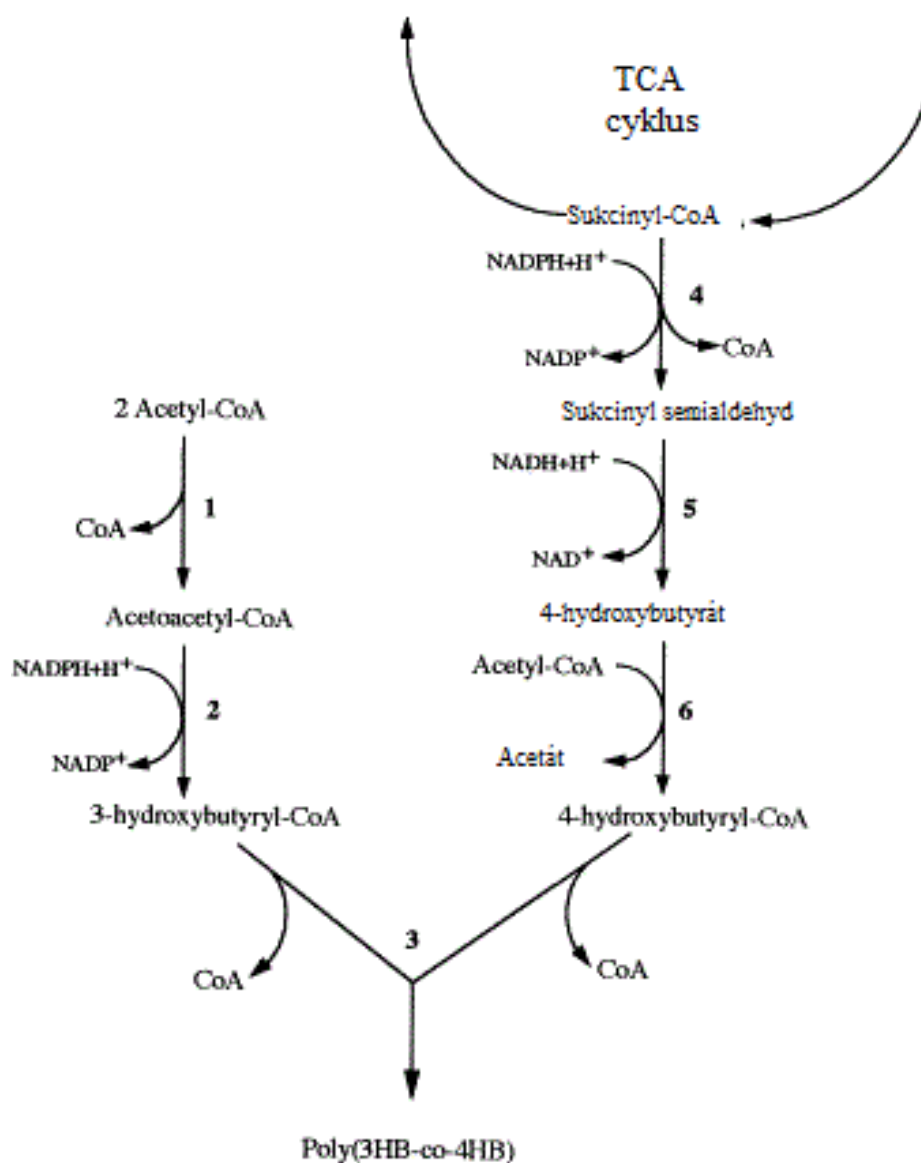
2.2.3.1 Rekombinantní *Escherichia coli*

Escherichia coli je gramnegativní fakultativně anaerobní bakterie, která byla nejdříve objevená v tlustém střevě člověka. Díky rozsáhlému výzkumu a vývoji je tato bakterie nejlépe charakterizovaným mikroorganismem. Hojně se využívá v molekulární biologii a je jedním z nejdůležitějších organismů používaných v průmyslu. Vzhledem k rychlému růstu, snadným kultivačním podmínkám, metabolické přizpůsobivosti, bohatému fyziologickému a biochemickému poznání se *E. coli* stala také jedním z nejlepších hostitelských organismů pro metabolické inženýrství a syntetickou biologii. Tato bakterie, která není přirozeným producentem polyhydroxyalkanoátů, byla také upravena pomocí rekombinantní DNA pro produkci tohoto polymeru a je zkoumán její potenciál pro uvedenou aplikaci [31, 32, 33].

Pro produkci poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) byl vyvinut rekombinantní kmen *Escherichia coli*, který je kultivován v komplexním médiu. Jako zdroj uhlíku je použita glukóza. K vyvinutí tohoto kmene vedlo zavedení genů biosyntézy polyhydroxyalkanoátů z bakterie *Cupriavidus necator* a genů pro degradaci sukcinátu z *Clostridium kluyveri* do *E. Coli DH5a*. Je již dobře známo, že operon biosyntézy PHA z *C. necator* je dostatečně exprimován v *Escherichia coli* ke zprostředkování biosyntézy polyhydroxybutyrátu. Zavedení genů suDD, 4hbD a orfZ z *Clostridium kluyveri* do *Escherichia coli* obsahující geny pro biosyntézu polyhydroxyalkanoátů usnadňuje produkci 4-hydroxybutyryl-CoA

pro produkci P(3HB-co-4HB), jak je uvedeno na obrázku 6. Zavedení tohoto genu navíc vedlo k tomu, že pro produkci cíleného polymeru není nutný okamžitý zdroj 4-hydroxybutyrátu, ale lze jednoduše syntetizovat ze sukcinátu nebo sukcinyl-CoA z cyklu kyseliny citronové, pokud je jako zdroj uhlíku použita glukóza [26, 34, 35].

Geneticky modifikované kmeny *Escherichia coli* jsou považovány za silné kandidáty pro produkci polyhydroxyalkanoátů a byly vyvinuty pro výrobu různých druhů PHA. Polyhydroxyalkanoáty jsou akumulovány uvnitř buněk ve formě inkluzních tělísek. Vzhledem k omezené velikosti buněk je omezena také akumulace PHA. Pro vyřešení tohoto problému bylo dosaženo zvětšení *Escherichia coli* prostřednictvím nadměrné exprese genu *sulA*, který slouží k inhibici buněčného dělení. To vedlo k tvorbě dlouhých vláknitých buněk, které disponují větším vnitřním prostorem oproti typickým tyčinkovitým buňkám, a tak v nich dochází k vyšší akumulaci PHA [36, 37].



Obrázek 6: Biosyntetická dráha poly(3HB-co-4HB) [26]

2.2.3.2 *Burkholderia sacchari*

Gramnegativní bakterie *Burkholderia sacchari* disponuje vysokým potenciálem pro průmyslovou výrobu bioplastů. Na základě přímé konverze sacharózy je *B. sacchari* vynikajícím producentem mikrobiálního homopolyesteru poly(3-hydroxybutyrátu). Mimo to je schopná produkovat poly(3-hydroxybutyrát) při využití dalších pentóz i hexóz. Vykazuje také vysokou produktivitu při biosyntéze kopolymeru poly(3HB-co-4HB). *Burkholderia sacchari* je schopna produkovat zmíněný kopolymer s využitím glukózy, jako zdroje uhlíku, a γ -butyrolaktonu (GBL) či kyseliny 4-hydroxymáselné, jako prekurzoru pro syntézu jednotek 4-hydroxybutyrátu [38, 39, 40].

Vzhledem k tomu, že vlastnosti poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrátu) silně závisí na molární frakci 4HB, je výhodné důkladně znát proces produkce cíleného polymeru. Byl studován vliv kultivačních podmínek na složení výsledného polymeru a produktivitu. Jako zdroj uhlíku byla použita glukóza, jako prekurzor jednotek 4HB γ -butyrolakton (GBL). Vyšší koncentrace GBL vede k vyššímu obsahu 4HB jednotek v polymeru za předpokladu, že koncentrace GBL pro buňky není toxická. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo při udržování stabilní koncentrace γ -butyrolaktonu na úrovni nižší než 10 g/l [38, 41].

2.2.3.3 *Cupriavidus necator* H16

Gramnegativní bakterie *Cupriavidus necator* H16 je jedním z modelových organismů pro studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů. Kromě toho, vzhledem ke své schopnosti využívat mnoho různých substrátů k akumulaci velkého množství PHA, se považuje za kandidáta pro průmyslovou výrobu bioplastů. *Cupriavidus necator* H16 je znám zejména pro produkci poly(3-hydroxybutyrátu). Zavedení 4-hydroxybutyrátové monomerní jednotky do tohoto polymeru poprvé popsal Doi a spol. Jeho vědecká skupina syntetizovala pomocí bakterie *Cupriavidus necator* H16 kopolyestery s různými poměry monomerních jednotek 3-hydroxybutyrátu a 4-hydroxybutyrátu [42, 43].

Jelikož je *Cupriavidus necator* H16 schopen produkovat P(3HB-co-4HB) s různými frakcemi 4-hydroxybutyrátu, vzrostl zájem o jeho studium za účelem produkce polymeru s co nejlepšími vlastnostmi. Obecně je poly(3-hydroxybutyrát-co-4-hydroxybutyrát) produkován za využití prekurzorových zdrojů uhlíku, jako je 4-hydroxymáselná kyselina, 1,4-butandiol a γ -butyrolakton. Výtěžky produkce však bývají nízké [44].

Rostlinné oleje jsou žádoucí surovinou pro produkci PHA, protože jsou výtěžky produkce vysoké a náklady na produkci nízké. Palmový olej je jedním z rostlinných olejů, který je hojně užíván jako tuk na smažení, margarín. Jedná se o druhý nejvíce produkováný ropný olej s roční produkcí až 27 000 000 tun. Jelikož obsahuje jen malé množství kyseliny linolové, inhibitoru růstu bakterie *Cupriavidus necator*, může být dosaženo vysokého výtěžku PHA. Použitý palmový olej, odpadní zbytek po smažení, je dobře dostupným zdrojem pro produkci PHA. Jeho použití také vede ke snížení nákladů. V současných studiích je používán spolu s 1,4-butandiolem jako prekurzorem 4-hydroxybutyrátu pro produkci P(3HB-co-4HB). Výsledky ukázaly, že využití těchto zdrojů k syntéze P(3HB-co-4HB) je nadějným způsobem pro produkci cíleného polymeru s vysokými výtěžky [44].

2.2.3.4 *Halomonas bluephagenesis*

Příští generace průmyslové biotechnologie založená na extremofilech slibuje snížit výrobní náklady spojené s komplikovanými sterilizačními procesy. Druh *Halomonas* patří k halofilním bakteriím, které mohou být použity k vývoji otevřených nesterilních a kontinuálních fermentačních procesů, protože jsou kultivovány v médiu s vysokou koncentrací soli. S nynějšími nástroji genetického inženýrství se *H. bluephagenesis* stává silným kandidátem pro průmyslovou výrobu polyhydroxyalkanoátů. Přirozeně *Halomonas bluephagenesis* nemůže syntetizovat P(3HB-co-4HB) z prekurzorů jako je γ -butyrolakton, avšak za využití strategií genového inženýrství může nahradit *E. coli* díky sníženým produkčním nákladům. Konkrétně zavedení genu orfZ kódujícího 4-hydroxybutyrát-CoA transferázu do *H. bluephagenesis* umožňuje produkci P(3HB-co-4HB) za využití prekurzoru γ -butyrolaktonu [30, 45, 46].

2.3 Produkce polyhydroxyalkanoátů pomocí *Cupriavidus malaysiensis*

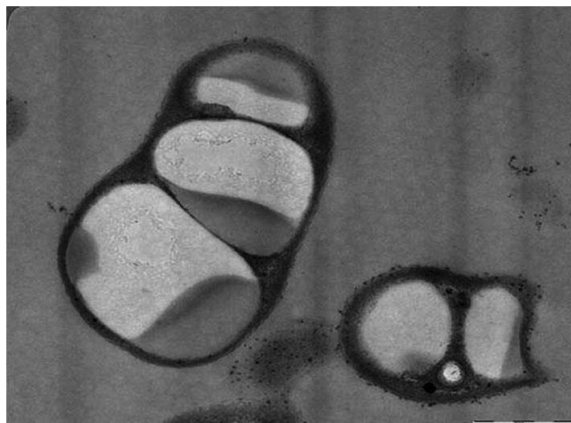
Rod *Cupriavidus* poprvé popsali Makkar a Casida, typovým druhem byl zvolen *Cupriavidus necator*. Jedná se o rod zahrnující gramnegativní, aerobní, nesporulující, tyčinkovité bakterie. Rod *Cupriavidus* v současné době zahrnuje celkem 17 druhů. *Cupriavidus necator* H16 je jedním z dobře prostudovaných producentů P(3HB-co-4HB). V poslední době bylo objeveno několik nových druhů, ke kterým patří také *Cupriavidus malaysiensis* [47, 48].

U tří kmenů bakterií akumulujících P(3HB-co-4HB) izolovaných ze vzorků odebraných v malajském prostředí byla provedena bakteriální klasifikace. K těmto kmenům patří DSM 25816, DSM 19416 a DSM 19379. Bylo prokázáno, že tyto gramnegativní, tyčinkovité, pohyblivé a nesporulující bakterie patří k rodu *Cupriavidus* na základě analýzy genové sekvence 16S rRNA a také na základě fenotypových charakteristik. Bylo také odhaleno, že jsou kmeny geneticky příbuzné, i když vykazovaly klonální rozmanitost. Genomy ukázaly přítomnost polyhydroxyalkanoátové syntázy (PhaC), což je klíčový enzym pro syntézu PHA. Jejich genomy také ukázaly, že tyto tři kmeny nejsou zcela identické, pokud jde o jejich genomové velikosti, které jsou 7,82 Mb; 7,95 Mb a 8,70 Mb u kmenů DSM 25816, DSM 19416 a DSM 19379. Tyto genomy jsou o něco větší než u kmene *Cupriavidus necator* H16, jehož genomová velikost je 7,42 Mb. U těchto tří kmenů bylo zjištěno, že pouze kmen DSM 25816 vykazuje žlutou pigmentaci, která je charakteristická pro skupinu karotenoidů. Na základě výsledků získaných v této studii jsou tyto kmeny považovány za nový druh, pro který je navržen název *Cupriavidus malaysiensis*. Typovým kmenem druhu je DSM 19416 [47, 48].

2.3.1 Charakterizace jednotlivých kmenů

Kmeny DSM 25816, DSM 19416 a DSM 19379 na agarové plotně tvoří kolonie o průměru 3 až 4 mm. Kolonie kmene DSM 19416 mají kruhový tvar s uceleným okrajem, jsou mukoidní a konvexní, zatímco kmen DSM 19379 tvoří ploché kolonie se zvrásněnými okraji. Kolonie DSM 19416 a DSM 19379 jsou zbarveny béžově a jsou neprůhledné. Kolonie kmene DSM 25816 bývají pigmentované žlutě. Jedná se o lesklé, mukoidní, hladké a konvexní kolonie s uceleným okrajem. Buňky tohoto druhu mají tyčinkovitý tvar s rovně zaoblenými konci.

Uvnitř buněk akumulují typické polyhydroxyalkanoátové granule. Granule uvnitř buněk odděluje jasné rozhraní, jedná se o diskrétní sférické částice [47].



Obrázek 7: Akumulace PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis* [47]

2.3.1.1 Pigment produkovaný kmenem DSM 25816

Mikrobiální pigmenty mají různé odstíny. Poskytují živiny, jako například vitamíny, a vykazují antimikrobiální a léčivé vlastnosti. Roste po nich poptávka, ačkoliv existuje celá řada pigmentů z ovoce a zeleniny. Důvodem je to, že jejich výroba nezávisí na sezónních a zeměpisných podmínkách. Jsou také stabilnější a snadněji zpracovatelné. Vzhledem k tomu, že mohou být produkovány za použití průmyslových zbytků, například z výroby džusu, snižují také znečištění životního prostředí i vody [49, 50].

Karotenoidy jsou jednou ze široce rozšířených tříd pigmentů v přírodě a jejich zbarvení se pohybuje od světle žluté přes oranžové až po tmavě červené. Bylo objeveno více než 600 karotenoidů, které byly charakterizovány strukturálně. Obecně mají tyto pigmenty velmi dobré antimikrobiální vlastnosti. Nachází aplikace v různýchruzích odvětví, a to ve farmacii, lékařství, zemědělství, potravinářství a podobně [49, 51].

Pigment produkovaný *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 představuje pravděpodobně novou sloučeninu karotenoidové skupiny. Spektrum infračervené spektroskopie s Fourierovou transformací a nukleární magnetické rezonance také ukázalo, že žlutý pigment může být složen z více než jedné sloučeniny. Pro objasnění struktury tohoto žlutého pigmentu je proto zapotřebí další purifikace a charakterizace. Úloha karotenoidu v životě a metabolismu dané bakterie také není plně pochopena. Lze ovšem předpokládat, že antimikrobiální vlastnosti žlutého pigmentu mohou hrát důležitou roli v přežití v nepřátelském prostředí [51].

2.3.2 Produkce P(3HB-co-4HB)

Mezi stávajícími PHA jsou homopolymer P(4HB) a kopolymer P(3HB-co-4HB) nejslibnějšími biomateriály pro účely zdravotní péče. Začlenění monomerních jednotek 4HB do polymerního řetězce P(3HB) mělo za následek tvorbu řady kopolymerů P(3HB-co-4HB) s širokým rozsahem mechanických i tepelných vlastností, které mohou být na míru použity na výrobky pro tkáňové inženýrství, jako jsou scaffoldy kostní dřeně, kardiovaskulární štěpy a obvazy na rány [52, 53].

Kopolymer P(3HB-*co*-4HB) se běžně uvádí v lékařských a farmaceutických aplikacích, což je způsobeno přítomností 4-hydroxybutyrátu. 4-hydroxymáselná kyselina se přirozeně vyskytuje v extraktech mozku, jater, ledvin, svalů, plic a srdce savců, například krysy, lidí, ale i holubů. Biokompatibilita a velmi dobrá rychlost degradace vedla k jejímu využití pro různé druhy léčby, jako je narkolepsie, anestezie a tak dále [47, 54].

Fermentativní produkce polyhydroxyalkanoátů je obvykle provozována jako dvoustupňový proces. Výzkumy uvádí, že dvoustupňová kultivace vedla k účinné produkci P(3HB-*co*-4HB) u *Cupriavidus malaysiensis*, DSM 19379. Při biosyntéze kopolymeru P(3HB-*co*-4HB) se používají ve druhém kroku prekurzorové substráty jako je γ -butyrolakton, 4-hydroxybutyrát sodný, 4-hydroxymáselná kyselina, 1,4-butandiol a 1,6-hexandiol. Tyto prekurzory mohou být použity pro dvoustupňovou kultivaci v druhém kroku, ale i jako jediný zdroj uhlíku při jednostupňové kultivaci. Alkandiol s delším uhlíkovým řetězcem byly také studovány jako potenciální prekurzorové substráty. Chai a spol. studovali produkci kopolymerů za použití 1,8-oktandiolu, 1,10-dekandiolu a 1,12-dodekandiolu ve dvoustupňové kultivaci. Mezi těmito prekurzory vedlo použití 1,8-oktandiolu k syntéze polymeru s vysokým obsahem 4-hydroxybutyrátu. Jedná se tedy o potenciální prekurzorový substrát pro získání P(3HB-*co*-4HB) s vysokým obsahem 4HB, ale s nízkou akumulací PHA kvůli toxicitě 1,8-oktandiolu vůči bakteriálním buňkám [51, 55].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité mikroorganismy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Použité mikroorganismy

V diplomové práci byly použity bakterie druhu *Cupriavidus malaysiensis*, a to kmeny DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816, zakoupeny v Leibnitz Institut DSMZ-German Collection of Microorganism and Cell Cultures, Německo. Dále byla použita bakterie *Cupriavidus necator* H16 CCM 3726 získaná z české sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně.

3.1.2 Použité chemikálie

NutrientBroth, Himedia
Agar Powder, Himedia
Glukosa, Lach-Ner
Fruktosa, Lach-Ner
Galaktosa, Lach-Ner
Sacharosa, Lach-Ner
Xylosa, Lach-Ner
Laktosa, Lach-Ner
Glycerol, Lach-Ner
Slunečnicový olej, Ceresol
Acetát sodný, Sigma-Aldrich
Propionát sodný, Sigma-Aldrich
Kyselina levulová, Sigma-Aldrich
Kyselina valerová, Sigma-Aldrich
 γ -butyrolakton, Sigma-Aldrich
1,4-butandiol, Sigma-Aldrich
1,6-hexandiol, Sigma-Aldrich
 ϵ -kaprolakton, Sigma-Aldrich

Všechny použité chemikálie byly čistoty p.a. a vyšší.

3.1.3 Použité přístroje

Analytické váhy, Boeco
Centrifuga vysokorychlostní chlazená, HERMLE, Z 36 HK
Centrifuga, Hettich EBA 20
ELISA Reader BioTek ELx808
Fermentor Sartorius BIOSTAT B® plus 2L, 5L
Inkubátor, LTE Scientific, IP60
Laboratorní váhy, Kern 440-43, Kern & Sohn GmbH
Laminární box Aura mini, Bio Air Instruments
Nanofotometr, IMPLN
pH metr, pHTestr 30, Thermo Scientific

Plynový chromatograf Trace 1300 GC Ultra FID detector, Finnigan; kolona Agilent J&W DB-WAX 30 m by 0,25 mm, Agilent Technologies; vyhodnocovací software: Thermo Software Xcalibur

SEC chromatograf s kolonou PLgel mixed-C 5 μ m, 300 by 7,5 mm, Agilent Technologies; detektory: MALS – DAWN HELEOS II, diferenční refraktometr OPTILAB T-REX, Wyatt Technology

TA Instruments, Q5000IR

Temperovaná třepačka, Heidolph1000, Labicom s.r.o

Teplotně modulovaný kalorimetr, TA Instruments, DSC Q2000

Vortex, Heidolph Reax Top

Dále bylo pro práci použito běžné laboratorní sklo a pomůcky.

3.2 Kultivace bakterií

3.2.1 Oživení bakteriálních kultur a jejich uchovávání

Bakterie dodané v lyofilizovaném stavu byly oživeny podle návodu dodavatele. Oživené buňky byly zaočkovány na pevné agarové plotny na Petriho miskách. Připravené médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Poté bylo médium mírně ochlazen a v laminárním boxu nalito v adekvátním množství do sterilních Petriho misek. Po zatuhnutí pevného média na něj byly zaočkovány bakteriální kultury křížovým roztěrem.

Složení pevného média:

NutrientBroth	25 g/l
Agar	15 g/l

Poté proběhla kultivace v termostatu při teplotě 30 °C po dobu 72 hodin. Po kultivaci byly bakterie uchovávány při teplotě 4 °C. Přeočkování bakteriálních kultur na nové Petriho misky bylo prováděno v pravidelném intervalu asi 20 dní.

3.2.1.1 Příprava kryozkumavek

Pro uchování bakteriálních kultur byly připraveny také kryozkumavky. Do každé kryozkumavky bylo napipetováno 0,5 ml 30% roztoku glycerolu. Uzavřené kryozkumavky byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Po sterilaci byly ochlazeny na laboratorní teplotu. Poté do nich byl v laminárním boxu zaočkován 1 ml inokula příslušné bakteriální kultury. Kryozkumavky byly poté dány do mrazicího boxu, kde byly uchovávány při teplotě –80 °C.

3.2.2 Příprava inokula

Inokulum pro všechny kultivace bylo připravováno do Erlenmeyerových baněk o objemu 100 ml s obsahem 50 ml média uvedeného níže. Médium bylo sterilováno v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min.

NutrientBroth	25 g/l
---------------	--------

Po ochlazení bylo inokulum třikrát zaočkováno bakteriologickou kličkou z agarové plotny v laminárním boxu. Po 24 hodinách kultivace na temperované třepačce s frekvencí třepání 180 rpm a teplotou 30 °C bylo inokulum používáno pro zaočkování produkčního média.

3.2.3 Kultivace bakterií za účelem produkce PHA

Pro produkci PHA byla připravená inokula přeočkována do produkčního média o objemu 100 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk. Minerální médium bylo připraveno o níže uvedeném složení.

(NH ₄)SO ₄	3 g
KH ₂ PO ₄	1,02 g
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O	11,1 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,063 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pro přípravu produkčních médií byly použity následující zdroje uhlíku:

γ-butyrolakton	8 g/l
ε-kaprolakton	8 g/l
1,4-butandiol	8 g/l
1,6-hexandiol	8 g/l
Fruktosa	20 g/l
Glukosa	20 g/l
Slunečnicový olej	20 g/l
Glycerol	20 g/l

Do každého minerálního média byl přidán roztok stopových prvků, jehož složení je vypsáno níže, v koncentraci 1 µl/ml:

FeCl ₃ · 6 H ₂ O	9,7 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	7,8 g
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,156 g
CoCl ₂ · 2 H ₂ O	0,119 g
NiCl ₂ · 4 H ₂ O	0,118 g
0,1 M HCl	1000 ml

K připraveným roztokům média byly přidány příslušné zdroje uhlíku o dané koncentraci. Připravené roztoky byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Pouze v případě využití fruktosy a glukosy jako zdroje uhlíku byla sterilace provedena s otevřeným ventilem. Po sterilaci a ochlazení média i roztoků bylo v laminárním boxu do minerálního média přidáno 100 µl roztoku stopových prvků. Do takto připravených médií bylo v laminárním boxu zaočkováno vždy 10 % inokula dané bakteriální kultury.

Připravené kultury byly kultivovány na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 72 hodin.

3.2.3.1 Dvoustupňová kultivace bakterií za účelem produkce P(3HB-co-4HB)

Pro dvoustupňovou kultivaci bylo připraveno produkční médium, jehož složení je uvedeno v kapitole 3.2.3, o objemu 100 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk. K připraveným roztokům média byla přidána fruktosa o koncentraci 20 g/l. Připravené roztoky byly sterilovány v tlakovém hrnci s otevřeným ventilem po dobu 30 min. Po sterilaci a ochlazení média bylo v laminárním boxu do minerálního média přidáno 100 µl roztoku stopových prvků, připraveného dle postupu popsaného v kapitole 3.2.3. Do takto připravených médií bylo v laminárním boxu zaočkováno vždy 10 % inokula dané bakteriální kultury. Připravené kultury byly kultivovány na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 30 hodin.

Poté byla stočena biomasa při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Biomasa po centrifugaci byla převedena do nového sterilního minerálního média s 1,4-butandiolem o koncentraci 8 g/l a 1 µl/ml stopových prvků. Postup přípravy média i roztoku stopových prvků byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.2.3, pouze koncentrace $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ v médiu byla jen 0,1 g/l. Poté probíhala kultivace na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 24 hodin.

3.2.3.2 Kultivace bakterií za účelem produkce terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV)

Pro kultivaci za účelem terpolymeru bylo do šesti 250ml Erlenmeyerových baněk připraveno 100 ml produkčního média, jehož složení je uvedeno v kapitole 3.2.3. K připraveným roztokům média byl do 3 Erlenmeyerových baněk přidán γ -butyrolakton o koncentraci 8 g/l, do zbylých tří 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Připravené roztoky byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Po sterilaci a ochlazení média bylo v laminárním boxu do minerálních médií přidáno 100 µl roztoku stopových prvků, připraveného dle postupu popsaného v kapitole 3.2.3. Do takto připravených médií bylo v laminárním boxu zaočkováno 10 % inokula daného bakteriálního kmene. Připravené kultury byly kultivovány na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 72 hodin. Po 24 hodinách kultivace byly ke kultivovaným bakteriím v minerálním médiu s γ -butyrolaktonem v laminárním boxu přidány prekurzory. Do jedné Erlenmeyerovy baňky byl přidán propionát sodný o koncentraci 1 g/l, do druhé kyselina valerová o koncentraci 1 g/l. Zároveň byla provedena kontrola bez přídavku prekurzoru. Stejný postup byl použit také s využitím 1,4-butandiolu.

3.2.3.3 Dvoustupňová kultivace bakterií za účelem produkce P(3HB-co-4HB-co-3HV)

Pro kultivaci s využitím glycerolu byla připravená produkční média, o složení uvedeném v kapitole 3.2.3, o objemu 100 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk. Tímto způsobem byla připravena média do 4 Erlenmeyerových baněk. K připraveným roztokům médií byl přidán glycerol o koncentraci 20 g/l do 2 Erlenmeyerových baněk a do dalších dvou byl přidán glycerol o koncentraci 12 g/l a 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Připravené roztoky byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Po sterilaci a ochlazení média bylo v laminárním boxu do minerálního média přidáno 100 µl roztoku stopových prvků, připraveného dle postupu popsaného v kapitole 3.2.3. Do takto připravených médií bylo v laminárním boxu zaočkováno vždy 10 % dané bakteriální kultury. Připravené kultury byly kultivovány na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 48 hodin.

Poté byla stočena biomasa při 6 000 rpm po dobu 5 minut. Biomasa po centrifugaci byla převedena do nového sterilního minerálního média s 1,4-butandiolem o koncentraci 8 g/l

a 1 µl/ml stopových prvků. Postup přípravy média i stopových prvků byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.2.3. Do jedné Erlenmeyerovy baňky s biomasou převedenou z kultivace s použitím glycerolu a do jedné Erlenmeyerovy baňky s biomasou převedenou z kultivace s použitím glycerolu v kombinaci s 1,4-butandiolem byla v laminárním boxu přidána kyselina valerová o koncentraci 1 g/l. Poté probíhala kultivace na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 24 hodin.

3.3 Kultivace a produkce PHA v bioreaktoru

Nejdříve bylo připraveno 400 ml inokula podle postupu uvedeného v kapitole 3.2.2. Po 24hodinové kultivaci bylo inokulum zaočkováno do 4 l sterilního minerálního média s γ -butyrolaktonem o koncentraci 8 g/l, připraveného podle postupu popsaného v kapitole 3.2.3., v bioreaktoru, do kterého byly také sterilně přidány 4 ml roztoku stopových prvků. Kultivace probíhala při 30 °C, pH 7, přítok kyslíku byl nastaven na 200 cm³/min a obsah rozpuštěného kyslíku na 20 %. Po 12 hodinách kultivace byla přidána další dávka γ -butyrolaktonu o koncentraci 8 g/l, přítok kyslíku byl zvýšen na 400 cm³/min. Celkově kultivace probíhala po dobu 24,5 hod.

Z kultivace v bioreaktoru byly pravidelně odebrány vždy 2 paralelní vzorky biomasy o objemu 10 ml. Tyto vzorky byly zpracovány podle postupu pro stanovení biomasy gravimetrickou metodou, viz kapitola 3.6. Ze sušené biomasy byly také připraveny vzorky na plynovou chromatografii dle postupu uvedeného v kapitole 3.7.2. Ze vzorků odebraných v čase 24,5 hod byl také izolován polymer (3.8.1), který byl dále analyzován.

3.4 Stanovení schopnosti utilizace různých zdrojů uhlíku

Pro stanovení schopnosti utilizace různých zdrojů uhlíku byly využity všechny kmeny bakteriálního druhu *Cupriavidus malaysiensis*. *Cupriavidus necator* H16 byl použit jako kmen kontrolní. Pro stanovení ideálního zdroje uhlíku pro nejvyšší produkci PHA bylo připraveno minerální médium o objemu 100 ml do 250ml Erlenmeyerovy baňky, dle postupu uvedeného v kapitole 3.2.3. Do sterilního média byl v laminárním boxu přidán roztok stopových prvků o výsledné koncentraci 1 µl/ml.

Vybrané zdroje uhlíku byly připraveny o objemu 100 ml do 250ml Erlenmeyerových baněk. Při přípravě roztoku kyseliny levulové a valerové bylo pH upraveno na hodnotu 7 pomocí roztoku hydroxidu sodného. Roztoky byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem, pouze roztoky cukrů byly sterilovány s otevřeným ventilem. Sterilace probíhala 30 min. Použité zdroje uhlíku jsou uvedeny níže.

Fruktosa	20 g/l
Glukosa	20 g/l
Galaktosa	20 g/l
Sacharosa	20 g/l
Xylosa	20 g/l
Laktosa	20 g/l
Glycerol	20 g/l
Slunečnicový olej	20 g/l
γ -butyrolakton	8 g/l

ε-kaprolakton	8 g/l
1,4-butandiol	8 g/l
1,6-hexandiol	8 g/l
Acetát sodný	4 g/l
Propionát sodný	4 g/l
Kyselina levulová	4 g/l
Kyselina valerová	4 g/l

Do mikrotitrační destičky bylo v laminárním boxu napipetováno vždy 100 µl minerálního média s roztokem stopových prvků, 50 µl zdroje uhlíku a 20 µl inokula daného bakteriálního kmene. Každý vzorek byl proveden ve 3 paralelních stanoveních. Po zaočkování bakteriálních kultur probíhala kultivace na temperované třepačce při 30 °C po dobu 72 hod. Absorbance při 630 nm byla zaznamenána v čase 0 hod a po skončení kultivace s využitím přístroje ELISA.

3.5 Studium vlivu kultivačních parametrů na produkci biomasy a PHA

3.5.1 Studium vlivu přítomnosti kyslíku

Do 250ml Erlenmeyerových baněk bylo pro každý studovaný kmen připraveno médium, o složení uvedeném v kapitole 3.2.3, o objemech 50 ml, 100 ml a 150 ml. Jako zdroj uhlíku byl pro tento experiment použit γ -butyrolakton o koncentraci 8 g/l. Připravené roztoky v Erlenmeyerových baňkách byly sterilovány v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Po ochlazení na laboratorní teplotu byl k připraveným médiím v laminárním boxu pipetován roztok stopových prvků o koncentraci 1 µl/ml. Následně byla média zaočkována příslušnými inokuly bakteriálních kmenů o koncentraci 1 ml/10 ml.

Poté probíhala kultivace připravených bakteriálních kultur v médiu o různých objemech na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 72 hodin.

3.5.2 Studium vlivu osmotické síly

Do 6 Erlenmeyerových baněk, 250 ml, bylo připraveno minerální médium o složení, které je uvedeno v kapitole 3.2.3., o objemu 100 ml. Do takto připravených médií byl pipetován 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l. Následně byl do Erlenmeyerových baněk přidán chlorid sodný o koncentraci 0, 5, 10, 15, 20 a 25 g/l. Média s obsahem soli byla míchána na magnetické míchačce do úplného rozpuštění složek. Poté byla sterilována v tlakovém hrnci s uzavřeným ventilem po dobu 30 min. Po sterilaci a ochlazení na laboratorní teplotu byl v laminárním boxu do médií přidán roztok stopových prvků o koncentraci 1 µl/ml. Následně byla média zaočkována 10 % inokula daného bakteriálního kmene.

Poté probíhala kultivace připravených bakteriálních kultur na temperované třepačce při 180 rpm a 30 °C po dobu 72 hodin.

3.6 Stanovení biomasy gravimetrickou metodou

Pro stanovení obsahu biomasy bylo odebráno vždy ve dvou paralelních provedeních 10 ml vzorku suspenze buněk do centrifugačních zkumavek. Vzorky byly stáčeny v centrifuze při 6 000 rpm po dobu 10 min. Po stočení byly odlity supernatanty a k sedimentům bylo přidáno 10 ml destilované vody. Sedimenty byly rozsuspendovány v destilované vodě. Suspenze byly

stočeny za stejných podmínek. Supernatanty byly slity a bylo přidáno 5 ml destilované vody. Sedimenty byly opět rozsuspendovány. Po stočení za výše uvedených podmínek a odlití supernatantu byly otevřené centrifugační zkumavky s promytými biomasami dány do sušárny a sušeny do konstantní hmotnosti při teplotě 70 °C. Poté byly vysušené biomasy zváženy na analytických vahách.

3.7 Stanovení obsahu a složení PHA v biomase

Ke kvantitativnímu i kvalitativnímu stanovení PHA ve vysušené biomase bylo využito plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem.

3.7.1 Stanovení kalibrační přímky

Do šroubovací vialky bylo naváženo asi 40 mg komerčně dostupného standardu PHB a byly přidány 4 ml chloroformu, tak aby výsledná koncentrace odpovídala přibližně 10 mg/ml. Vialka byla uzavřena a dána do termobloku zahřát na 70 °C po dobu 20 min do úplného rozpuštění standardu. Připravený ochlazený roztok byl pipetován do krimpovacích vialek o objemech 0,05; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 a 1 ml. Roztoky byly ve vialkách následně doplněny chloroformem na objem 1 ml. Následně bylo přidáno 0,8 ml transesterifikační směsi složené z 15 % roztoku kyseliny sírové v metanolu a interního standardu, 5 mg/ml kyseliny benzoové. Zakrimpované vialky byly vloženy do termobloku, kde byly při teplotě 94 °C esterifikovány po dobu 3 hodin. Po ochlazení byly vzorky extrahovány 0,5 ml 0,05 M NaOH. Po vytvoření fázového rozhraní byla spodní chloroformová, fáze o objemu 50 µl pipetována do šroubovacích vialek s již připraveným chloroformem o objemu 950 µl. Vialky byly okamžitě uzavřeny a následně analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

Pro stanovení kalibrační přímky pro stanovení obsahu 3-hydroxyvalerátu byl použit stejný postup s využitím 45 mg komerčně dostupného kopolymeru P(3HB-*co*-3HV) s obsahem 12 mol. % 3HV.

Pro ověření retenčního času 4HB byl využit komerčně dostupný kopolymer P(3HB-*co*-4HB), obsah 4HB v tomto kopolymeru však nebyl znám, proto pro kvantifikaci 4HB byla využita kalibrační přímka pro 3HB.

3.7.2 Příprava vzorků na plynovou chromatografii

Do krimpovacích vialek bylo naváženo zhruba 10 mg sušené biomasy. Do vialek s naváženou biomasou byl napipetován 1 ml chloroformu a 0,8 ml transesterifikační směsi. Vialky byly uzavřeny a dány do termostatu k esterifikaci při teplotě 94 °C po dobu 3 hodin. Po esterifikaci byly vzorky vyjmuty z termostatu a ochlazeny na laboratorní teplotu. Do velkých šroubovacích vialek bylo pipetováno 0,5 ml 0,05 M NaOH a přidán obsah krimpovacích vialek se vzorky. Roztoky byly protřepány. Po vytvoření fázového rozhraní byla spodní, chloroformová, fáze o objemu 50 µl pipetována do menších šroubovacích vialek s již připraveným chloroformem o objemu 950 µl. Vialky byly okamžitě uzavřeny a poté analyzovány pomocí plynové chromatografie s FID detekcí.

3.8 Izolace pHA a jeho další charakterizace

3.8.1 Izolace polymeru

Pro izolaci polymeru bylo z vybraných kultur po 72hodinové kultivaci odebráno 50 ml buněčné suspenze do centrifugačních zkumavek. Uzavřené zkumavky se vzorky byly zahřívány při teplotě 70 °C po dobu 24 hodin. Poté byly biomasy stáčeny při 10 000 rpm po dobu 10 min. Supernatant byl slit a sediment byl rozsuspendován v 10 ml destilované vody. Poté proběhlo stočení za stejných podmínek. Supernatant byl slit a sediment byl opět rozsuspendován v 10 ml destilované vody. Po opětovném stočení za stejných podmínek byla biomasa sušena při 70 °C do konstantní hmotnosti.

Do 100 ml Erlenmeyerových baněk se zábrusem byla kvantitativně převedena sušená biomasa. Bylo přidáno 50 ml chlorofomu pomocí odměrného válce. Erlenmeyerovy baňky byly uzavřeny a umístěny na temperované třepačce při 50 °C a 170 rpm po dobu 24 hodin. Poté byly roztoky z Erlenmeyerových baněk filtrovány přes filtrační papír. Cílený polymer byl získán z filtrátu po odpaření chloroformu.

3.8.2 Vylučovací chromatografie s detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech

Do šroubovacích vialek bylo naváženo asi 5 mg vyizolovaného polymeru a poté pipetován 1 ml chloroformu. Vialky byly uzavřeny a vloženy do termobloku, kde byly zahřívány při teplotě 70 °C do úplného rozpuštění polymeru. Po rozpuštění a ochlazení na laboratorní teplotu byly roztoky pomocí stříkaček a stříkačkových filtrů s porozitou 0,45 µm přefiltrovány do malých šroubovacích vialek, ve kterých byla provedena analýza.

3.8.3 Diferenciální skenovací kalorimetrie

Pro tuto analýzu byla využita malá množství vyizolovaného polymeru, která byla podrobena zvolenému teplotnímu programu ve třech následujících cyklech. V prvním cyklu byly vzorky zahřívány na teplotu 190 °C. Tato teplota byla udržována po dobu 1 minuty. Ve druhém cyklu byly vzorky chlazeny až na teplotu -100 °C. V rámci třetího cyklu byly vzorky opět zahřívány, a to na teplotu 200 °C. Teplotní rampa byla ve všech cyklech nastavena na 10 °C/min. Pro vyhodnocení byla využita data získaná během třetího cyklu měření.

3.8.4 Termogravimetrická analýza

Pro termogravimetrickou analýzu byla využita malá množství vyizolovaného polymeru, která byla podrobena termogravimetrické analýze. Došlo k tepelnému namáhání vzorku, kdy byla sledována změna hmotnosti na mikrováhách.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Schopnost utilizace různých zdrojů uhlíku

Za účelem stanovení optimálního zdroje uhlíku pro růst jednotlivých kmenů bakteriálního druhu *Cupriavidus malaysiensis* a produkci PHA byly využity substráty uvedené v kapitole 3.2.3.3. Pro tento experiment byl kromě již zmíněného druhu vybrán taxonomicky podobný kmen *Cupriavidus necator* H16 jako kmen kontrolní. Kultivace probíhala v mikrotitrační destičce při teplotě 30 °C, 180 rpm po dobu 72 hodin. Růst studovaných bakterií byl vyhodnocen spektrofotometrickou metodou pomocí přístroje ELISA.

Tabulka 1: Spektrofotometrické stanovení optimálního zdroje uhlíku

Zdroj C	Bakteriální kmen			
	H16	19416	19379	25816
Fruktosa	0,95	1,07	0,82	0,46
Glukosa	0,43	0,30	0,64	0,28
Galaktosa	0,28	0,20	0,34	0,33
Sacharosa	0,02	0,21	0,32	0,31
Xylosa	0,25	0,21	0,27	0,34
Laktosa	0,29	0,21	0,33	0,36
Glycerol	0,25	0,58	0,79	0,50
Slunečnicový olej	0,20	0,20	0,64	0,34
γ -butyrolakton	0,17	0	0,86	0,30
ϵ -kaprolakton	0,08	0	0,59	0
1,4-butandiol	0,28	0,70	0,72	0,81
1,6-hexandiol	0,18	0,78	0,81	0,83
Acetát sodný	0,25	0,48	0,56	0,37
Propionát sodný	0,09	0,25	0,51	0,27
Kyselina valerová	0,53	0,21	0,12	0,07
Kyselina levulová	0,25	0,00	0,12	0,06

0,00-0,30
0,31-0,50
0,51-0,75
>0,75

Tabulka 1 ukazuje výsledky spektrofotometrického stanovení schopnosti utilizace vybraných zdrojů uhlíku námi studovanými bakteriálními kmeny. Glukosa nebývá obecně dobře využívána kmenem *Cupriavidus necator* H16 pro růst [56]. Tento zdroj uhlíku nedokázal příliš dobře využít ani druh *Cupriavidus malaysiensis*. Podobně tomu bylo i u ostatních cukernatých zdrojů s výjimkou fruktosy, kterou vybraný kontrolní kmen umí naopak utilizovat velmi dobře [57]. Za využití fruktosy dosáhl druh *Cupriavidus malaysiensis* také významného růstu. Co se týče druhu *Cupriavidus malaysiensis*, nejslabšího růstu v tomto testu dosahoval kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, což mohlo být způsobeno na příklad oslabeným inokulem, které bylo očkováno. V tomto testu se jako optimální zdroje uhlíku pro růst studovaných kmenů jeví fruktosa, 1,4-butandiol či 1,6-hexandiol.

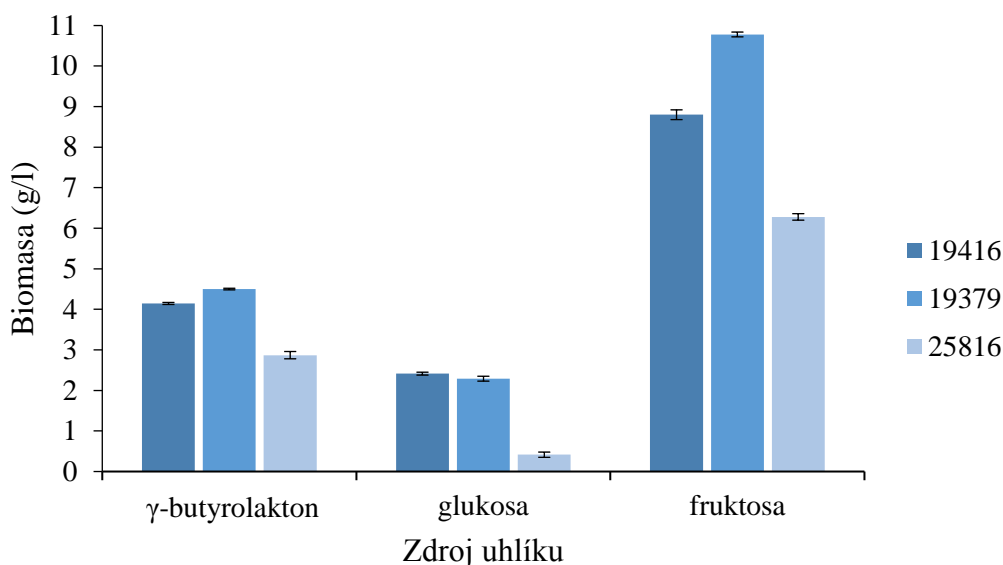
Dle výsledků tohoto experimentu tedy usuzujeme, že ideálními zdroji uhlíku pro růst vybraných mikroorganismů jsou fruktosa, 1,4-butandiol či 1,6-hexandiol. Proto jsme se rozhodli tyto zdroje využít i v dalších experimentech. Kromě jmenovaných substrátů jsme vybrali pro další

experimenty také glukosu, jelikož se jedná o levný zdroj pro kultivaci. Glukosa je také uváděna v člancích popisujících produkci P(3HB-co-4HB) rekombinantní *Escherichia coli* jako zdroj uhlíku [24]. V dalších experimentech byl využit také slunečnicový olej jako zdroj uhlíku, protože podle provedeného testu jsou studované bakteriální kmeny *Cupriavidus malaysiensis* schopny částečně využít tento zdroj. Využití oleje pro růst a produkci PHA by také mohlo vést k využití odpadního oleje pro produkci cíleného polymeru. Dalšími vybranými zdroji uhlíku byly γ -butyrolakton a ϵ -kaprolakton. V člancích zaměřených na produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) druhem *Cupriavidus malaysiensis* bývají γ -butyrolakton i ϵ -kaprolakton často zmiňovány jako velmi dobré prekurzory pro syntézu tohoto polyhydroxyalkanoátu [56, 58].

4.2 Výběr optimálního zdroje uhlíku

4.2.1 Fruktosa, glukosa, γ -butyrolakton

Za účelem produkce polymeru byly na základě předchozích experimentů vybrány následující zdroje uhlíku, a to fruktosa, glukosa a γ -butyrolakton. Tyto látky byly využity pro kultivaci v minerálním médiu v Erlenmeyerových baňkách. Pro daný experiment byly použity jednotlivé kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis*. Po 3denní kultivaci byl vyhodnocen růst biomasy gravimetrickou metodou i obsah a složení PHA pomocí plynové chromatografie s plamenově-ionizační detekcí.



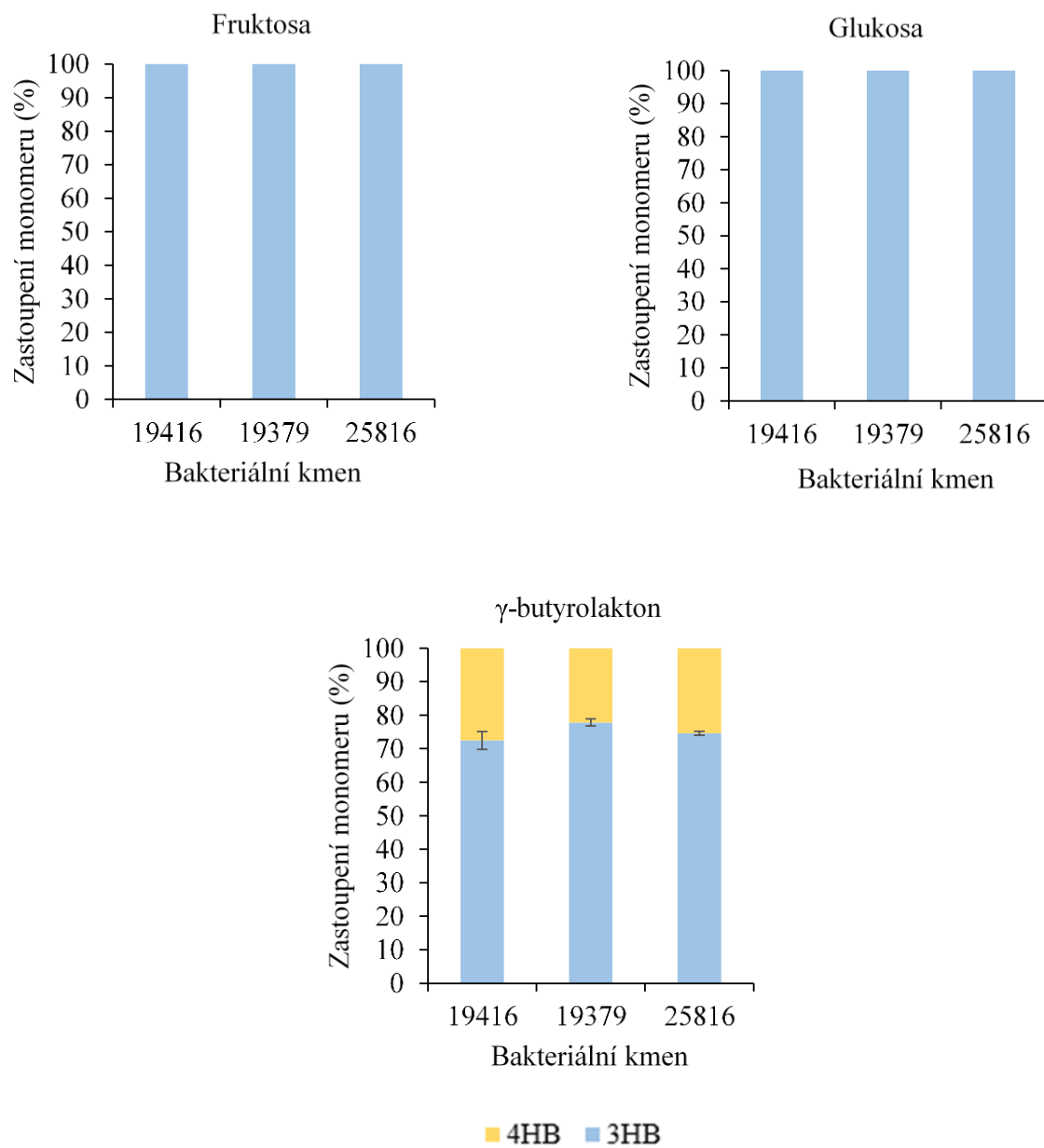
Obrázek 8: Gravimetrické stanovení biomasy (fruktosa, glukosa, γ -butyrolakton)

Z výsledného grafu vidíme, že námi studovaný druh *Cupriavidus malaysiensis* je schopný nejlepšího růstu za využití fruktosy jako zdroje uhlíku, což potvrzuje velmi dobré výsledky stanovení schopnosti utilizace. Oproti testům v mikrotitračních destičkách bylo dosaženo vysokého zisku biomasy také s využitím γ -butyrolaktonu. To může být způsobeno právě tím, že se bakterie jinak chová ve velmi malém objemu média a jinak ve větším množství média, kde má také větší prostor pro svůj růst a lepší přístup kyslíku či živin. Usuzujeme tedy, že by γ -butyrolakton mohl být optimálním zdrojem uhlíku pro zisk velkého množství biomasy, a také kýženého kopolymeru P(3HB-co-4HB). Glukosa se jako substrát pro růst příliš neosvědčila. Mikroorganismy nebyly schopny dobře využít tento zdroj uhlíku. Co se týče jednotlivých bakteriálních kmenů, nejlepšího růstu dosáhl bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Naopak nejméně biomasy jsme získaly při kultivaci bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816.

Tabulka 2: Stanovení obsahu a složení PHA (fruktosa, glukosa, γ -butyrolakton)

Kmen	Zdroj uhlíku	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
19416	fruktosa	8,80 ± 0,12	50,25 ± 0,54	4,42 ± 0,05	0	100
	glukosa	2,42 ± 0,03	8,45 ± 0,27	0,20 ± 0,02	0	100
	γ -butyrolakton	4,15 ± 0,02	31,06 ± 0,03	1,29 ± 0,08	27,56 ± 2,66	72,44 ± 2,66
19379	fruktosa	10,78 ± 0,06	69,95 ± 0,42	7,54 ± 0,10	0	100
	glukosa	2,29 ± 0,06	10,03 ± 0,06	0,23 ± 0,02	0	100
	γ -butyrolakton	4,50 ± 0,02	35,84 ± 0,92	1,61 ± 0,12	22,18 ± 1,06	77,82 ± 1,06
25816	fruktosa	6,28 ± 0,08	51,37 ± 0,04	3,23 ± 0,01	0	100
	glukosa	0,42 ± 0,06	3,26 ± 0,15	0,01 ± 0,01	0	100
	γ -butyrolakton	2,87 ± 0,09	47,80 ± 0,40	1,37 ± 0,08	25,40 ± 0,59	74,60 ± 0,59

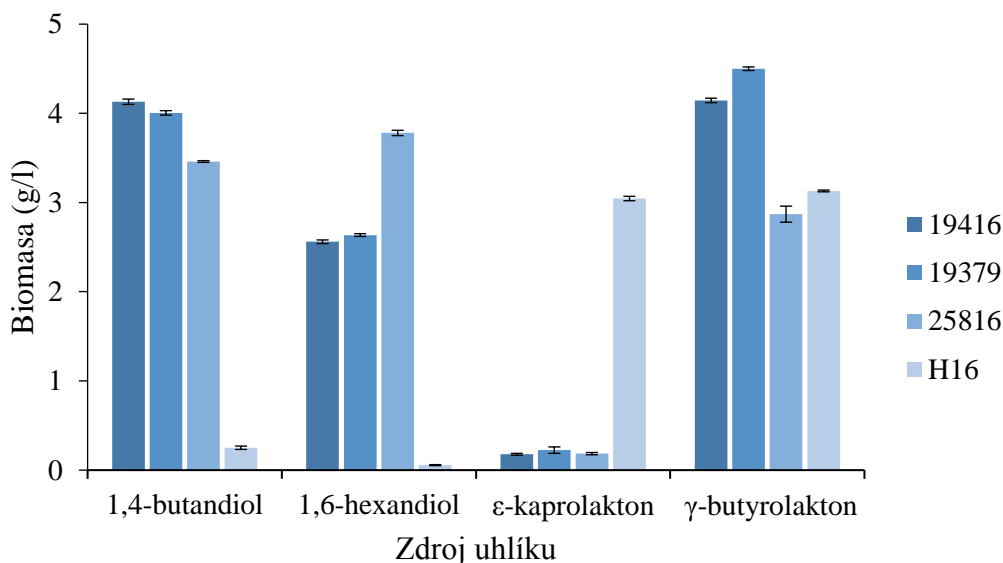
Z výsledků plynové chromatografie zobrazených v tabulce (tabulka 2) a na obrázku (obrázek 9) vidíme, že bakteriální druh *Cupriavidus malaysiensis* produkuje nejvíce PHA za využití fruktosy jako zdroje uhlíku. Jedná se o homopolymer 3-hydroxybutyrátu. Naším cílem je ovšem vyprodukovat kopolymer P(3HB-co-4HB) s co nejvyšším podílem 4-hydroxybutyrátu. Tento výsledek pro nás tedy i přes vysoký zisk polymeru není příznivý. Za využití glukosy jako zdroje uhlíku nebyly námi studované mikroorganismy schopny ani vysokého růstu, ani vysoké produkce polymeru. Navíc získaný polymer byl složen pouze z monomerů 3-hydroxybutyrátu. Glukosa tedy není vhodným zdrojem uhlíku ani pro růst druhu *Cupriavidus malaysiensis*, ani pro produkci cíleného kopolymeru. Při využití γ -butyrolaktonu jako zdroje uhlíku byl námi studovaný bakteriální druh schopen produkovat cílený kopolymer. Koncentrace produkovaného PHA u kmene DSM 19416 byla sice nejnižší, a to $1,29 \pm 0,08$ g/l, ale molární podíl 4HB v kopolymeru byl mezi studovanými kmeny nejvyšší, $27,56 \pm 2,66$ mol. %. Rozdíly v produkci polyhydroxyalkanoátu ani v jeho složení však u jednotlivých kmenů nejsou příliš výrazné. U kmene DSM 19379 byla koncentrace PHA nejvyšší, $1,61 \pm 0,12$ g/l, za to podíl 4-hydroxybutyrátu byl v kopolymeru nejnižší, $22,18 \pm 1,06$ mol. %. Kmen DSM 25816 produkoval kopolymer v koncentraci $1,37 \pm 0,08$ g/l o složení $25,40 \pm 0,59$ mol. % 4HB a $74,60 \pm 0,59$ mol. % 3HB. Můžeme tedy říci, že γ -butyrolakton je dobrým prekurzorem pro syntézu kopolymeru P(3HB-co-4HB). To potvrzuje výsledky studie Rahayu a spol, kterým se podařilo získat dokonce 2,25 g/l, ale s nižším obsahem 4HB [55].



Obrázek 9: Složení PHA (fruktosa, glukosa, γ -butyrolakton)

4.2.2 Využití dalších prekurzorů 4HB – 1,4-butandiolu, 1,6-hexandiolu a ϵ -kaprolaktonu

Mezi další vybrané zdroje uhlíku s ohledem na výsledky experimentu popsaného v kapitole 4.1 patří 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol i ϵ -kaprolakton. Pro srovnání byl využit také γ -butyrolakton, jelikož se jedná o již studovaný zdroj uhlíku, s využitím kterého jsou zkoumané bakterie schopny produkce P(3HB-co-4HB). V tomto experimentu byl využit druh *Cupriavidus malaysiensis* a jako kmen kontrolní byl použit také kmen *Cupriavidus necator* H16. Kultivace probíhala ve 100 ml minerálního média ve 250ml Erlenmeyerových baňkách při 30 °C, 180 rpm po dobu 72 hodin.



Obrázek 10: Gravimetrické stanovení biomasy (1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, ϵ -kaprolakton)

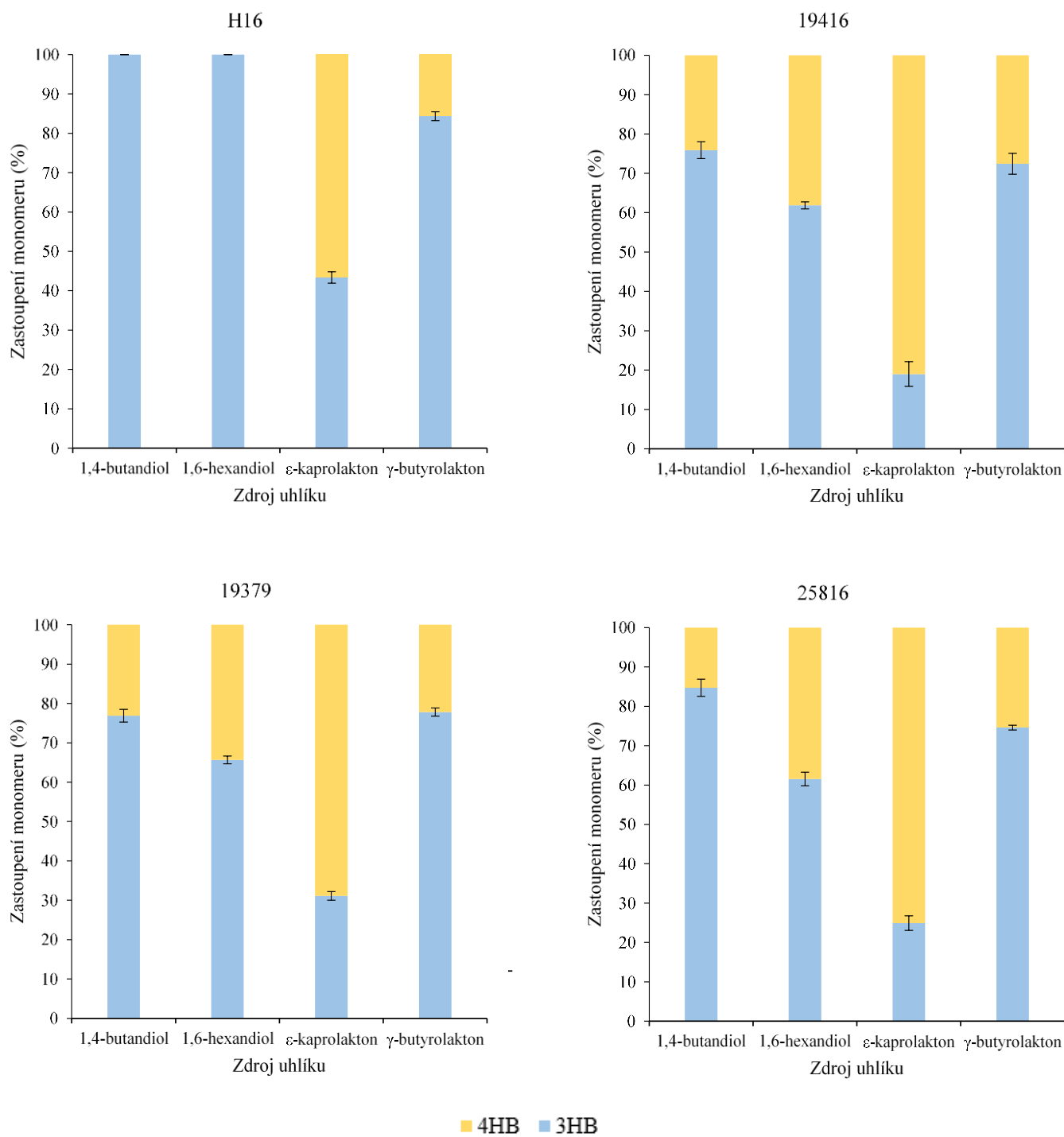
V tomto experimentu kmeny DSM 19416 a DSM 19379 druhu *Cupriavidus malaysiensis* byly schopny nejlépe využít 1,4-butandiol pro svůj růst, zatímco *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 1,6-hexandiol. Koncentrace biomasy u výše uvedených příkladů je srovnatelná s koncentrací biomasy za využití γ -butyrolaktonu jako zdroje uhlíku. Kontrolní kmen *Cupriavidus necator* H16 byl schopen nejlepšího růstu za využití ϵ -kaprolaktonu jako zdroje uhlíku, kdežto druh *Cupriavidus malaysiensis* nebyl příliš schopen tuto látku ke svému růstu využít. *Cupriavidus necator* H16 dokázal jen velmi málo využít 1,4-butandiol a 1,6-hexandiol. Alkandiol, jako na příklad testovaný 1,4-butandiol, patří k velmi dobrým prekurzorům pro syntézu cíleného kopolymeru P(3HB-co-4HB) a bakterie jsou jej také schopny dobře využít pro svůj růst [58]. Z výsledků tedy vyvozujeme, že 1,4-butandiol, stejně jako γ -butyrolakton, patří k optimálním zdrojům uhlíku pro růst bakteriálního druhu *Cupriavidus malaysiensis*, potažmo pro syntézu cíleného kopolymeru. Co se týče bakterie *Cupriavidus necator* H16, z těchto vybraných zdrojů uhlíku, se jeví ϵ -kaprolakton jako nejvhodnější pro vysoký zisk biomasy.

Tabulka 3: Stanovení obsahu a složení PHA (1,4-butandiol, 1,6-hexandiol a ϵ -kaprolakton)

Kmen	Zdroj uhlíku	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
H16	1,4-butandiol	0,25 ± 0,02	5,71 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0	100
	1,6-hexandiol	0,06 ± 0,01	14,58 ± 0,23	0,01 ± 0,01	0	100
	ϵ -kaprolakton	3,05 ± 0,03	48,55 ± 0,53	1,48 ± 0,01	56,63 ± 1,44	43,37 ± 1,44
	γ -butyrolakton	1,48 ± 0,04	25,43 ± 1,82	0,38 ± 0,03	15,67 ± 1,11	84,33 ± 1,11
19416	1,4-butandiol	4,13 ± 0,03	19,49 ± 0,02	0,81 ± 0,03	24,14 ± 2,14	75,86 ± 2,14
	1,6-hexandiol	2,56 ± 0,02	37,85 ± 0,15	0,97 ± 0,02	38,15 ± 0,88	61,85 ± 0,88
	ϵ -kaprolakton	0,18 ± 0,01	41,09 ± 0,43	0,07 ± 0,01	81,01 ± 3,14	18,99 ± 3,14
	γ -butyrolakton	4,15 ± 0,02	31,06 ± 0,03	1,29 ± 0,08	27,56 ± 2,66	72,44 ± 2,66
19379	1,4-butandiol	4,01 ± 0,02	11,67 ± 0,06	0,47 ± 0,03	23,12 ± 1,61	76,88 ± 1,61
	1,6-hexandiol	2,64 ± 0,01	39,83 ± 0,95	1,05 ± 0,07	34,35 ± 0,96	65,65 ± 0,96
	ϵ -kaprolakton	0,22 ± 0,04	42,80 ± 0,61	0,10 ± 0,04	68,89 ± 1,12	31,11 ± 1,12
	γ -butyrolakton	4,50 ± 0,02	35,84 ± 0,92	1,61 ± 0,12	22,18 ± 1,06	77,82 ± 1,06
25816	1,4-butandiol	3,46 ± 0,01	7,72 ± 0,01	0,27 ± 0,01	15,30 ± 2,19	84,70 ± 2,19
	1,6-hexandiol	3,78 ± 0,03	35,05 ± 0,04	1,32 ± 0,08	38,46 ± 1,74	61,54 ± 1,74
	ϵ -kaprolakton	0,19 ± 0,01	47,50 ± 0,01	0,09 ± 0,04	75,07 ± 1,83	24,93 ± 1,83
	γ -butyrolakton	2,87 ± 0,09	47,80 ± 0,40	1,37 ± 0,08	25,40 ± 0,59	74,60 ± 0,59

Tabulka 3 znázorňuje výsledky plynové chromatografie pro stanovení obsahu a složení PHA za využití 1,4-butandiolu, 1,6-hexandiolu a ϵ -kaprolaktonu jako zdroje uhlíku a prekurzoru pro syntézu PHA. Pro srovnání jsou uvedeny i výsledky s využitím γ -butyrolaktonu. Obrázek 11 pak znázorňuje graficky složení PHA. *Cupriavidus necator* H16 produkoval nejvíce cíleného kopolymeru za využití ϵ -kaprolaktonu, a to $1,48 \pm 0,01$ g/l, s velmi vysokým molárním podílem 4-hydroxybutyrátu, $56,63 \pm 1,44$ mol. %. Kmen *Cupriavidus necator* H16 nebyl s využitím ostatních substrátů schopen tvorby P(3HB-co-4HB), ale pouze homopolymeru 3-hydroxybutyrátu, a to ve velmi malém množství.

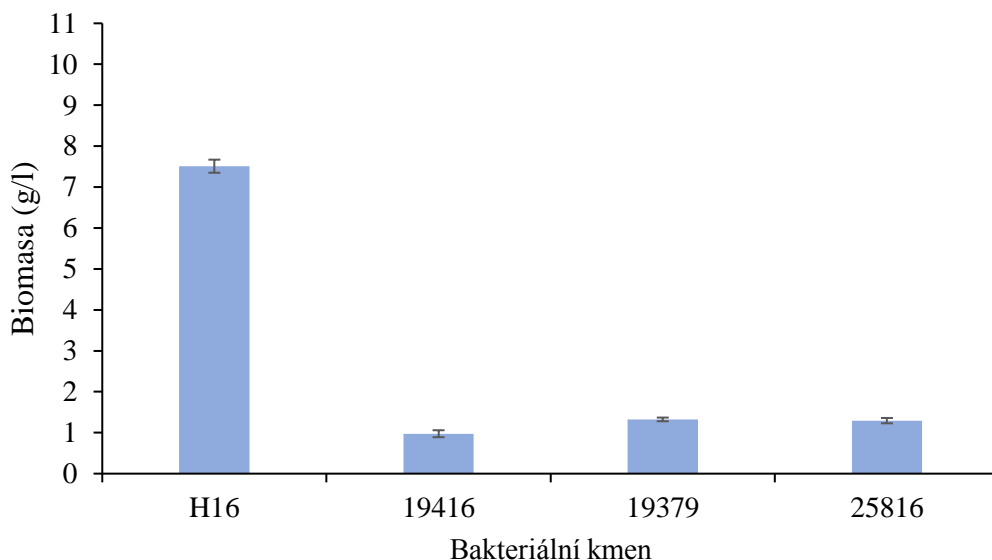
Co se týče druhu *Cupriavidus malaysiensis*, dokázal syntetizovat kopolymer za využití všech zdrojů uhlíku. Nejvyšší podíl 4HB v kopolymeru byl získán při použití ϵ -kaprolaktonu, u kmene DSM 19416 dokonce $81,01 \pm 3,14$ mol. %, produkce polymeru však byla velmi nízká, u zmíněného kmene pouze $0,07 \pm 0,01$ g/l. Vysokého molárního podílu 4-hydroxybutyrátu v kopolymeru bylo dosaženo také při využití 1,6-hexandiolu, a to okolo 35 %. Nejnižšího podílu 4HB v kopolymeru P(3HB-co-4HB) bylo dosaženo u 1,4-butandiolu. Složení kopolymeru ale i u tohoto prekurzoru bylo velmi příznivé. Nejlepšího výsledku bylo dosaženo u kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, kdy koncentrace PHA byla $0,81 \pm 0,03$ g/l a molární podíl 4HB $24,14 \pm 2,14$ %. Z výsledků tohoto experimentu vyvozujeme, že 1,4-butandiol i 1,6-hexandiol představují vhodné prekurzory pro tvorbu cíleného kopolymeru. Celkově tedy můžeme říci, že 1,4-butandiol je nejen vhodným zdrojem uhlíku pro růst druhu *Cupriavidus malaysiensis*, ale také dobrým prekurzorem pro syntézu P(3HB-co-4HB). To potvrzuje výsledky studie, které interpretoval Amirul se svým vědeckým týmem [59].



Obrázek 11: Složení PHA (1,4-butandiol, 1,6-hexandiol, ε-kaprolakton)

4.2.3 Využití oleje jako substrátu pro produkci PHA

Experiment s využitím oleje jako prekurzorem pro tvorbu kopolymeru P(3HB-co-4HB) by mohl vést k využití odpadního oleje pro produkci této velmi slibné náhrady běžných plastů. Využití odpadního oleje by velmi snížilo vstupní náklady, a tak i výslednou cenu cíleného polymeru. Z tohoto důvodu jsme se také rozhodli provést experiment s využitím oleje pro růst a produkci polyhydroxyalkanoátů pomocí bakteriálních kmenů DSM 19379, DSM 19416 a DSM 25816 druhu *Cupriavidus malaysiensis*. Produkce P(3HB) kmenem *Cupriavidus necator* H16 je již dobře popsána, proto byl tento kmen použit jako kmen kontrolní [60, 61].



Obrázek 12: Gravimetrické stanovení biomasy (olej)

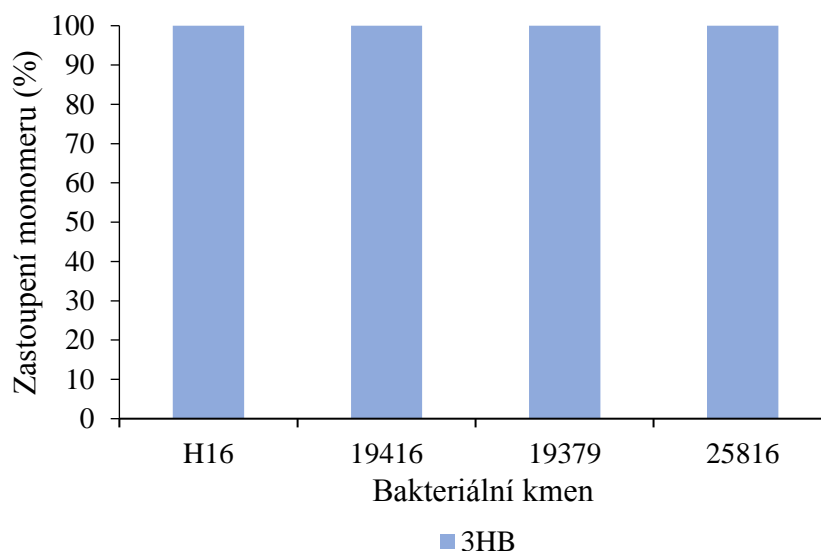
Obrázek 12 znázorňuje schopnost tvorby biomasy za využití oleje jako zdroje uhlíku. Z výsledného grafu vidíme, že bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 je schopen velmi dobré produkce biomasy s využitím oleje pro svůj růst. Koncentrace biomasy dosáhla téměř 8 g/l. Kdež to bakteriální druh *Cupriavidus malaysiensis* obecně nebyl schopen dobré utilizace tohoto substrátu. U kmene DSM 19379 bylo dosaženo nejvyšší produkce biomasy, a to $1,33 \pm 0,05$ g/l. Naopak nejnižší produkce u kmene DSM 19416, $0,98 \pm 0,09$ g/l. Výsledky tedy nejsou příliš vyhovující. Olej není vhodným substrátem pro růst druhu *Cupriavidus malaysiensis*.

Tabulka 4: Stanovení obsahu a složení PHA (olej)

Kmen	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
H16	7,51 ± 0,16	45,98 ± 1,14	3,453 ± 0,172	0	100
19416	0,98 ± 0,09	1,30 ± 0,12	0,013 ± 0,005	0	100
19379	1,33 ± 0,05	0	0	0	0
25816	1,30 ± 0,06	0,30 ± 0,01	0,004 ± 0,001	0	100

Z tabulky výsledků pro stanovení obsahu a složení PHA za využití oleje jako zdroje uhlíku na první pohled vidíme, že ani jeden ze studovaných bakteriálních kmenů není schopen využít tuto látku jako prekurzor pro tvorbu kopolymeru 3-hydroxybutyrátu s podílem

4-hydroxybutyrátu. Studované bakteriální kmeny jsou schopny syntetizovat pouze homopolymer 3-hydroxybutyrátu, a to ve velice malém množství. *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 dokonce nebyl schopen produkce ani homopolymeru poly(3-hydroxybutyrátu). Celkově produkce PHA u druhu *Cupriavidus malaysiensis* byla velmi nízká. O poznání jinak tomu bylo u kmene *Cupriavidus necator* H16, který byl schopen vyprodukovat $3,453 \pm 0,172$ g/l PHA. O produkci P(3HB) kmenem *Cupriavidus necator* H16 za využití oleje pro růst biomasy a produkci polymeru bylo již dříve napsáno mnoho článků, které tento experiment potvrzuje [61].

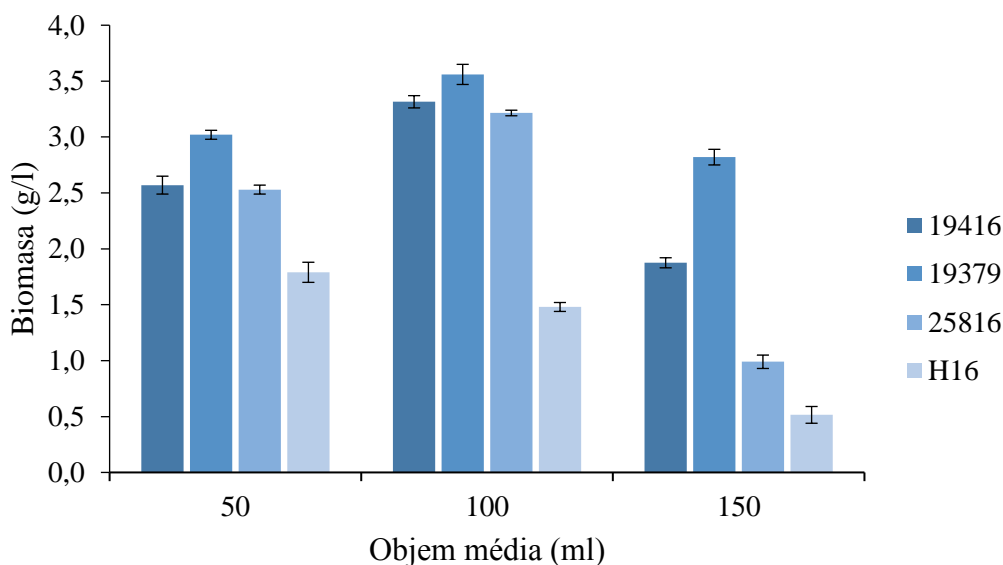


Obrázek 13: Složení PHA (olej)

4.3 Studium vlivu kultivačních parametrů na produkci PHA

4.3.1 Vliv obsahu kyslíku na produkci biomasy a PHA

Pro experiment stanovení vlivu přítomnosti kyslíku na produkci biomasy a PHA, včetně jeho složení, byla pro každý studovaný kmen připravena řada tří 250ml Erlenmeyerových baněk s různými objemy minerálního média, a to 50 ml, 100 ml a 150 ml. Logicky pak obsah kyslíku pro růst mikroorganismu a produkci polymeru klesal se zvyšujícím se obsahem média. Jako zdroj uhlíku byl použit γ -butyrolakton, který je podle výsledků předchozích experimentů vhodným zdrojem uhlíku nejen pro růst vybraných bakterií, ale i pro produkci cíleného P(3HB-co-4HB).



Obrázek 14: Gravimetrické stanovení biomasy (obsah kyslíku)

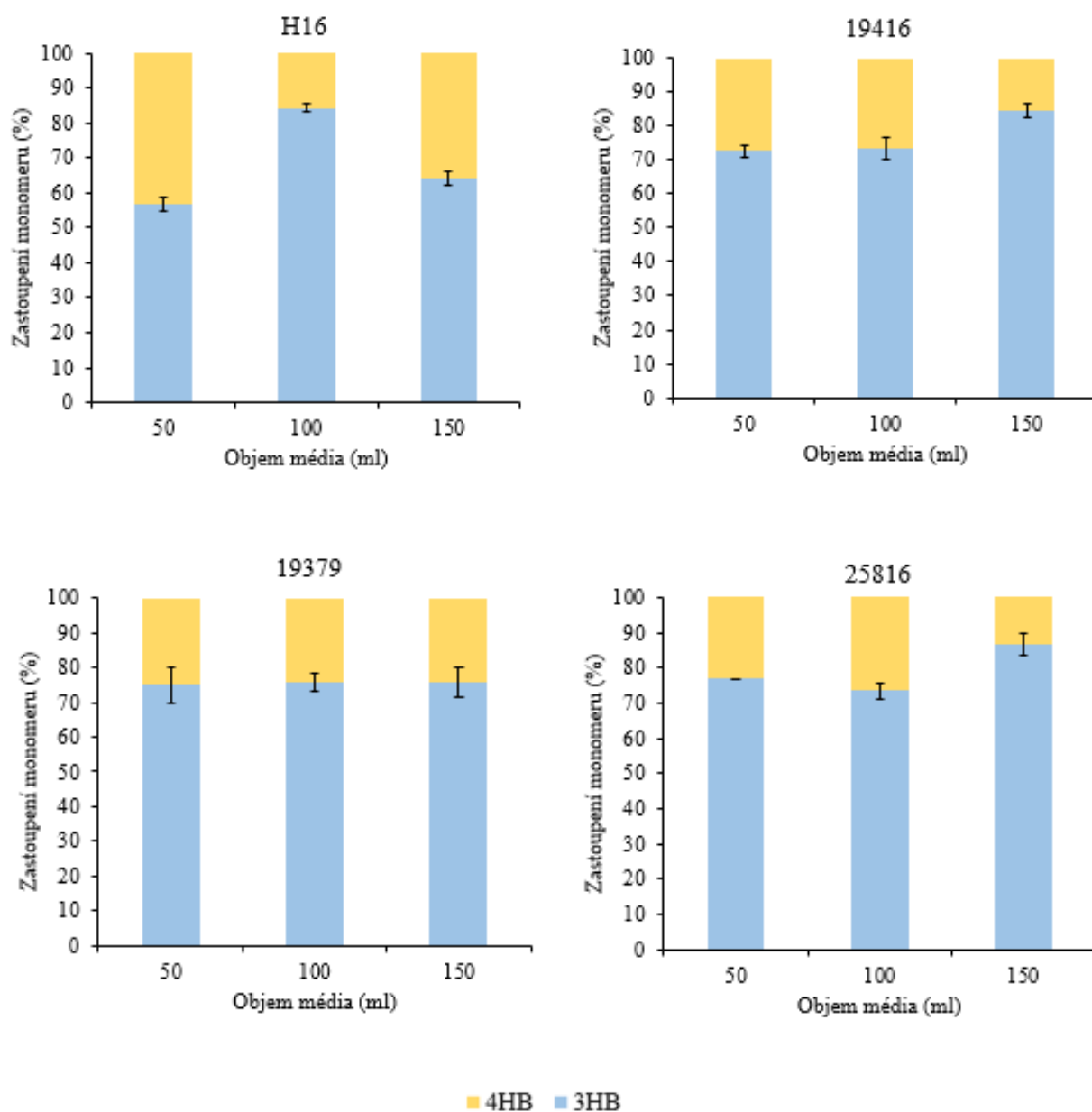
Po 3denní kultivaci byly připraveny vzorky pro gravimetrické stanovení biomasy. Na obrázku výše je již znázorněna koncentrace biomasy v závislosti na objemu média, respektive obsahu kyslíku. Druh *Cupriavidus malaysiensis* rostl nejlépe v objemu média 100 ml, kdy objem média byl dostatečný pro dobrý růst a zároveň obsah kyslíku nebyl tak nízký, aby růst tlumil. Nejmenšího růstu bylo dosaženo v médiu o objemu 150 ml, tedy v prostředí s nejnižším obsahem kyslíku, kdy měl tento stresový faktor, limitace kyslíkem, zjevný utlumující účinek. Jinak tomu bylo v případě kontrolního kmene, *Cupriavidus necator* H16. Zde koncentrace biomasy klesala s rostoucím objemem média, a tedy s klesajícím obsahem kyslíku.

Tabulka 5: Stanovení obsahu a složení PHA (obsah kyslíku)

Kmen	Objem média	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
H16	50 ml	1,79 ± 0,09	12,84 ± 0,31	0,23 ± 0,01	43,39 ± 2,13	56,61 ± 2,13
	100 ml	1,48 ± 0,04	25,43 ± 1,82	0,38 ± 0,03	15,67 ± 1,11	84,33 ± 1,11
	150 ml	0,52 ± 0,07	17,92 ± 2,01	0,09 ± 0,03	35,86 ± 2,13	64,14 ± 2,13
19416	50 ml	2,57 ± 0,08	51,76 ± 1,46	1,33 ± 0,07	27,50 ± 1,78	72,50 ± 1,78
	100 ml	3,32 ± 0,06	52,87 ± 0,08	1,75 ± 0,09	26,49 ± 3,11	73,51 ± 3,11
	150 ml	1,88 ± 0,04	50,73 ± 0,18	0,95 ± 0,03	15,36 ± 1,93	84,64 ± 1,93
19379	50 ml	3,02 ± 0,04	51,63 ± 1,21	1,56 ± 0,09	24,85 ± 5,12	75,15 ± 5,12
	100 ml	3,56 ± 0,09	55,11 ± 0,37	1,96 ± 0,11	24,29 ± 2,43	75,71 ± 2,43
	150 ml	2,82 ± 0,07	55,54 ± 0,66	1,57 ± 0,08	24,03 ± 4,22	75,97 ± 4,22
25816	50 ml	2,53 ± 0,04	58,11 ± 1,72	1,47 ± 0,08	23,14 ± 0,03	76,86 ± 0,03
	100 ml	3,22 ± 0,02	56,42 ± 0,67	1,81 ± 0,10	26,50 ± 2,34	73,50 ± 2,34
	150 ml	0,99 ± 0,06	68,13 ± 2,26	0,67 ± 0,02	13,30 ± 3,32	86,70 ± 3,32

Tabulka 5 ukazuje výsledky plynové chromatografie pro stanovení obsahu a složení PHA u studovaných kmenů v závislosti na objemu média, a tedy obsahu kyslíku. Z výsledné tabulky je patrné, že nejvyšší produkce PHA bylo dosaženo při kultivaci v minerálním médiu o objemu 100 ml, a to u všech studovaných kmenů. Zajímavé tedy je, že *Cupriavidus necator* H16 dosáhl sice nejvyššího růstu v médiu o objemu 50 ml, ale produkce PHA byla nejvyšší v médiu o objemu 100 ml. Je možné předpokládat, že částečná limitace kyslíkem pozitivně stimuluje produkci PHA. Co se týče produkce polyhydroxyalkanoátů druhem *Cupriavidus malaysiensis*, jak již bylo zmíněno, nejvyšší koncentrace PHA byla získána v médiu o objemu 100 ml a nejnižší v živném médiu o objemu 150 ml, stejně jako u koncentrace biomasy, což potvrzuje limitující vliv tohoto stresového faktoru jak na produkci biomasy, tak na produkci polymeru. Pouze u kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 byla produkce PHA v médiu o objemu 150 ml i 50 ml téměř shodná i s ohledem na chybu měření. Když vezmeme v úvahu jednotlivé kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis*, nejlepším producentem je právě kmen DSM 19379, který byl schopen vyprodukovat v médiu o objemu 100 ml $1,96 \pm 0,11$ g/l PHA.

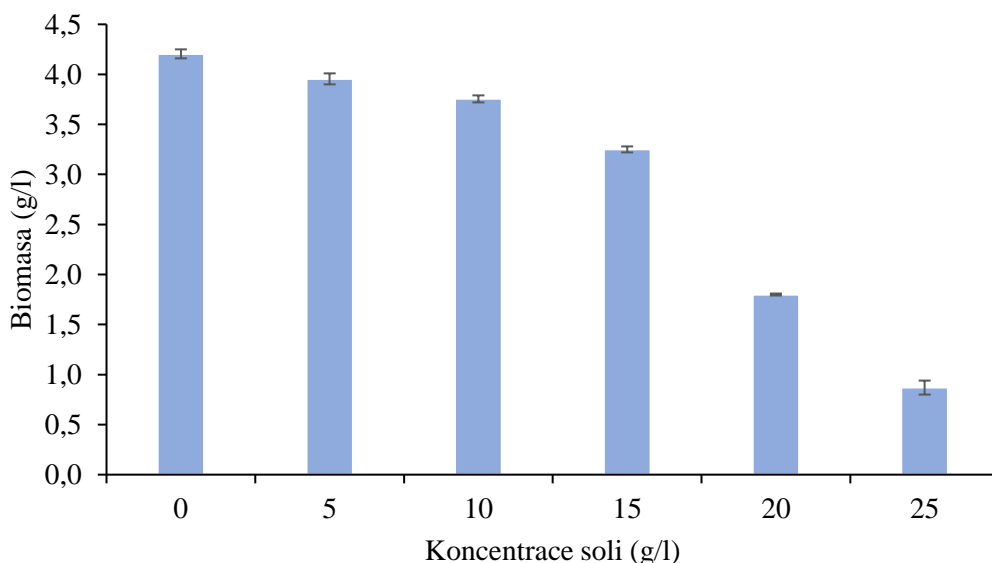
Co se týká složení polymeru, které je znázorněno dále v textu (obrázek 15) u kmene *Cupriavidus necator* H16 bylo dosaženo vysokého podílu 4-hydroxybutyrátu při kultivaci v médiu o objemu 50 ml a 150 ml. Při kultivaci v médiu o objemu 100 ml tedy bylo získáno sice největší množství polymeru, ale s nejnižším molárním podílem 4HB. U druhu *Cupriavidus malaysiensis* byl podíl 4-hydroxybutyrátu v polymeru u všech kmenů porovnatelný v médiu o objemu 50 ml a 100 ml. Při kultivaci v médiu o objemu 150 ml byl podíl 4HB u všech kmenů nižší, u kmene DSM 19379 však jen nepatrně. Což bylo způsobeno zřejmě tím, že nižší obsah kyslíku působil jako stresový faktor, a tak docházelo spíše k produkci 3HB než 4HB. Z výsledků studia vlivu obsahu kyslíku na růst biomasy a produkci polymeru tedy usuzujeme, že ideální je objem 100 ml média ve 250ml Erlenmeyerových baňkách. Experiment neprokázal výrazný vliv dostupnosti kyslíku na složení kopolymeru.



Obrázek 15: Složení PHA (obsah kyslíku)

4.3.2 Vliv osmotické síly na produkci biomasy a PHA

Pro studium vlivu osmotické síly na produkci biomasy a PHA, včetně jeho složení, byl vybrán kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, protože podle předchozích stanovení se jedná o nejlépe rostoucí a nejproduktivnější kmen. Jako zdroj uhlíku byl pro tento experiment vybrán 1,4-butandiol, jelikož výsledky růstu i produkce byly u všech provedených testů s tímto substrátem velmi dobré. Pro stanovení vlivu osmotické síly byla připravena řada minerálních médií s koncentrací NaCl od 5 g/l po 25 g/l. Byl také připraven kontrolní vzorek s koncentrací soli 0 g/l.



Obrázek 16: Gravimetrické stanovení biomasy (osmotická síla)

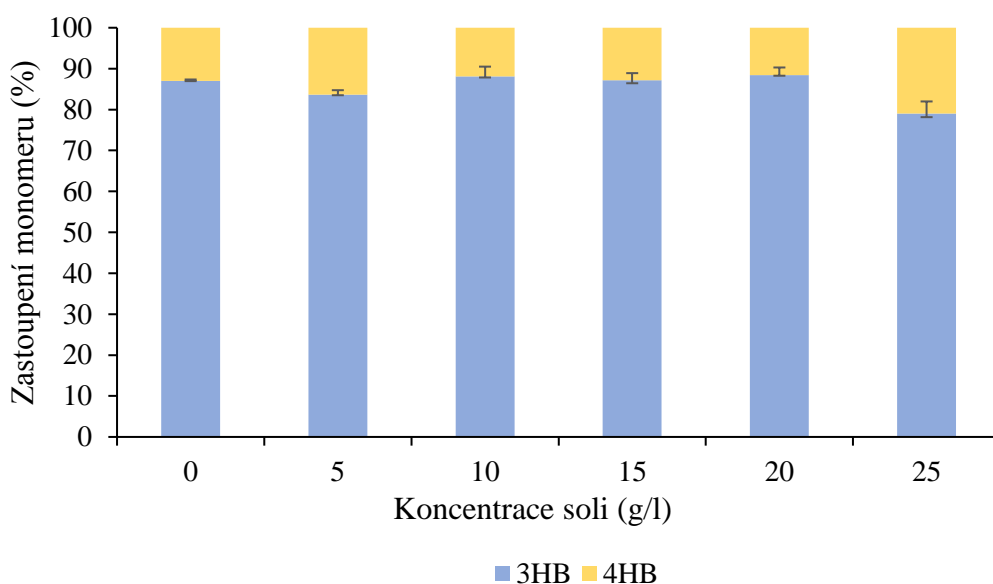
Z výsledků gravimetrického stanovení biomasy zobrazených na obrázku výše (obrázek 16) vidíme, že s rostoucí osmotickou silou klesá produkce biomasy. Osmotický stres má za následek vylučování vody z buněk do prostředí, kdy dochází ke snaze buňky vyrovnat koncentraci iontů uvnitř buňky a v jejím okolí. Můžeme tedy vyvodit, že přítomnost soli v minerálním médiu působí negativně na růst vybraného mikroorganismu. Na druhou stranu podle některých literárních zdrojů plní PHA protektivní funkci vůči osmotickému stresu [62] a osmotický stres má potenciál indukovat nadprodukcí polymeru bakteriálními buňkami [63, 64]. Při koncentraci NaCl rovné 25 g/l byla koncentrace biomasy již velmi nízká.

Tabulka 6: Stanovení obsahu a složení PHA (osmotická síla)

Koncentrace soli	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
0 g/l	4,21 ± 0,04	31,92 ± 0,89	1,34 ± 0,12	13,02 ± 0,37	86,98 ± 0,37
5 g/l	3,96 ± 0,05	29,15 ± 0,06	1,15 ± 0,10	16,39 ± 1,12	83,61 ± 1,12
10 g/l	3,76 ± 0,04	20,70 ± 0,12	0,78 ± 0,13	11,92 ± 2,41	88,08 ± 2,41
15 g/l	3,25 ± 0,03	27,58 ± 0,22	0,90 ± 0,08	12,85 ± 1,75	87,15 ± 1,75
20 g/l	1,80 ± 0,01	20,65 ± 0,31	0,37 ± 0,12	11,55 ± 1,83	88,45 ± 1,83
25 g/l	0,87 ± 0,07	53,24 ± 1,07	0,46 ± 0,25	20,94 ± 2,92	79,06 ± 2,92

Tabulka 6 představuje výsledky plynové chromatografie pro stanovení vlivu osmotického stresu na produkci a složení PHA. Z výsledků usuzujeme, že s rostoucí osmotickou silou klesá nejen koncentrace biomasy, jak již bylo zmíněno výše, ale také produkce polymeru. Stresové podmínky způsobené vysokou koncentrací iontů v prostředí buněk tedy negativně ovlivňují produkci polymeru u mikroorganismu *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Potenciál indukce PHA syntézy měla až nejvyšší koncentrace NaCl, kdy obsah PHA v biomase dosáhl více než 50 hm. %, což je v rámci tohoto experimentu nejvyšší hodnota. Nicméně produkce biomasy byla vysokou osmotickou silou natolik inhibována, že toto pozorování nemá reálné biotechnologické využití.

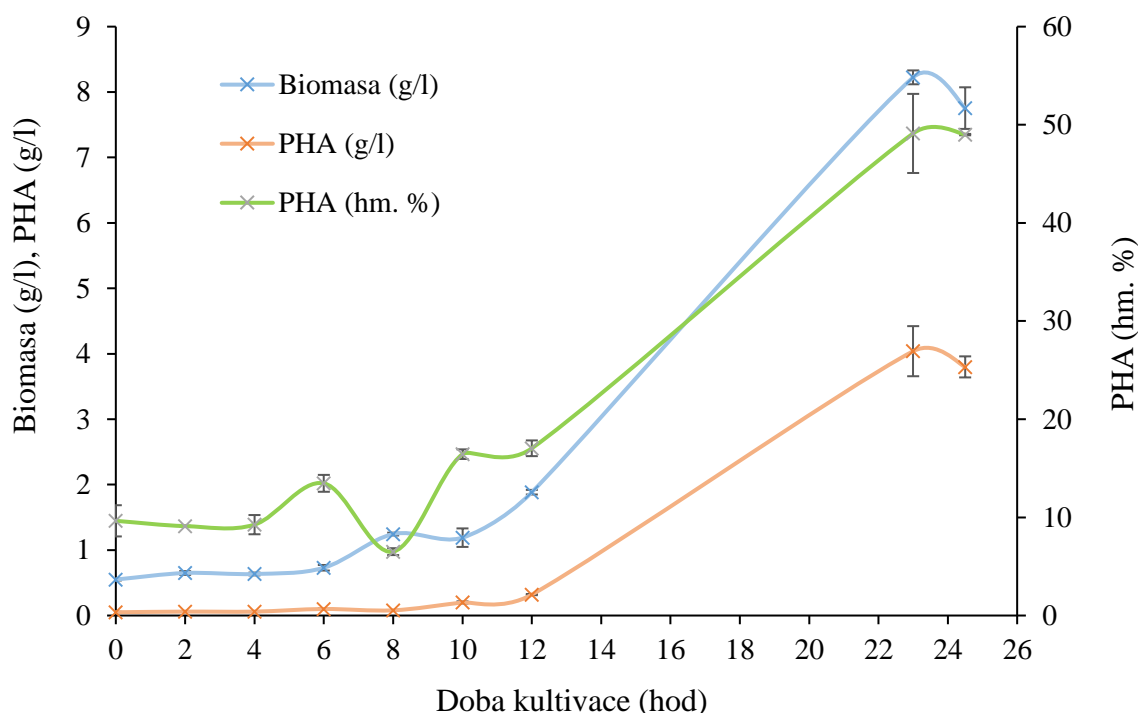
Složení polymeru nebylo osmotickým stresem příliš ovlivněno (obrázek 17), molární podíl 4-hydroxybutyrátu se pohyboval okolo 15 %. Nepatrně vyšší podíl 4HB vidíme u polymeru produkovaného v médiu s obsahem soli 25 g/l. Je tedy možné, že při vyšším osmotickém stresu bude tento kmen produkovat kopolymer s vyšším obsahem 4-hydroxybutyrátu, celková produkce však bude spíše nízká.



Obrázek 17: Složení PHA (osmotická síla)

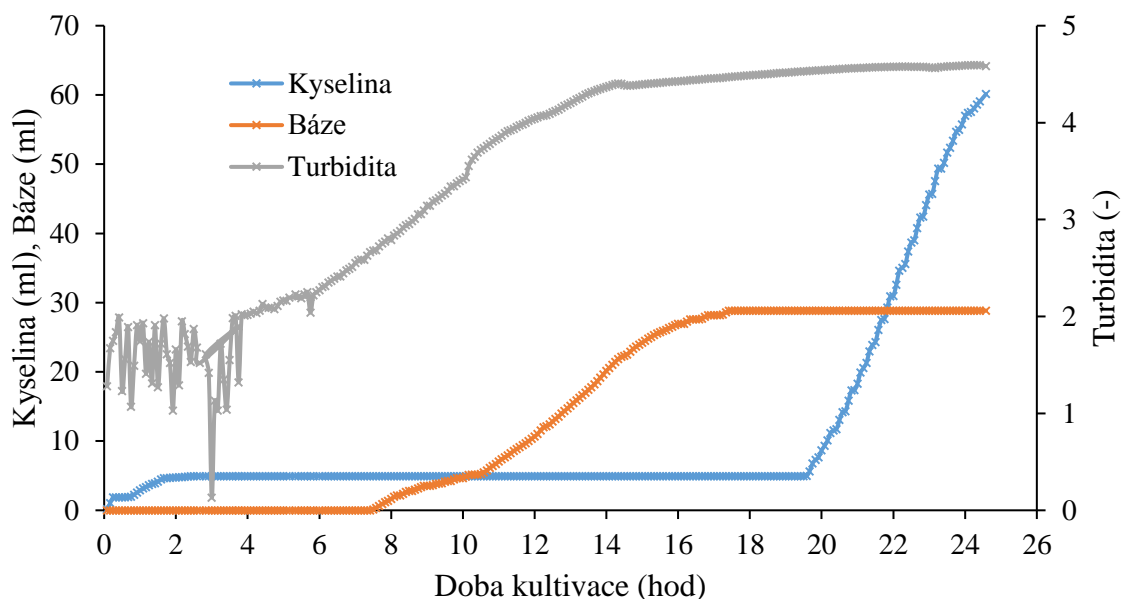
4.4 Kultivace a produkce PHA s využitím bioreaktoru

Vzhledem k výsledkům předchozích analýz jsme pro kultivaci v bioreaktoru vybrali kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Jako zdroj uhlíku byl vybrán γ -butyrolakton, protože s využitím této látky byl vybraný mikroorganismus schopen nejvyšší produkce cíleného polymeru. Zdroj uhlíku byl přidán v koncentraci 8 g/l do minerálního média před zaočkováním vybraným mikroorganismem a po 12 hodinách kultivace. Jednalo se tedy o fed-batch kultivaci.



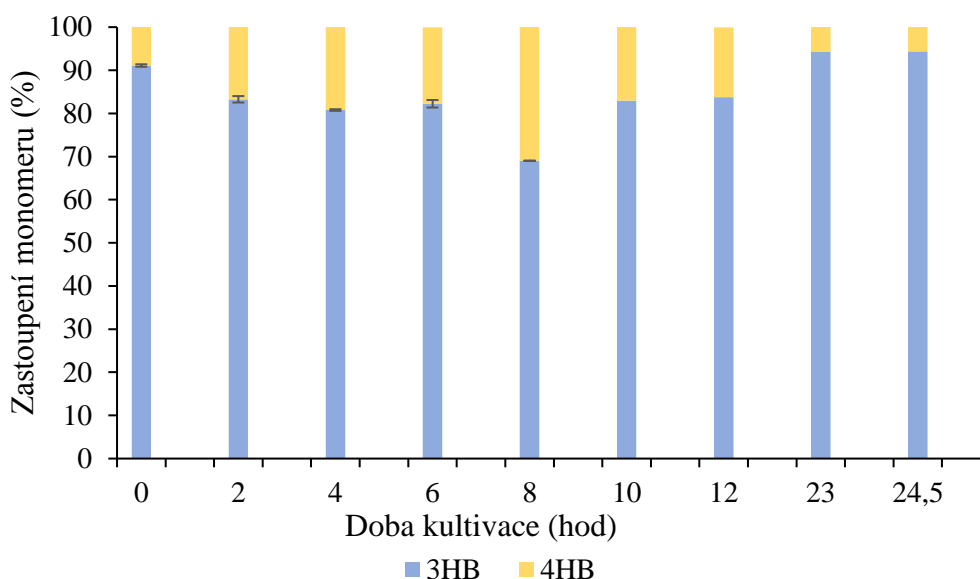
Obrázek 18: Produkce biomasy a PHA při kultivaci v bioreaktoru

Obrázek 18 znázorňuje křivky závislosti koncentrace biomasy, PHA a hmotnostního podílu PHA na době kultivace. Všechny křivky mají velmi podobný tvar. Koncentrace biomasy, PHA i hmotnostní podíl PHA zůstávaly téměř stejné po 8. hodinu kultivace, poté exponenciálně rostly až do 23. hodiny, kdy ustal růst a koncentrace biomasy ani PHA, stejně jako hmotnostní obsah PHA, se více méně neměnily. Z výsledných křivek tedy můžeme odvodit, že lag fáze trvala 8 hodin. V této fázi růstu se počet buněk téměř nezvyšuje, protože se mikroorganismus adaptuje na nové podmínky prostředí. Po 8. hodině započala exponenciální fáze, která trvala pravděpodobně 15 hodin. V růstové fázi jsou podmínky pro růst optimální a počet buněk se exponenciálně zvyšuje. S rostoucím počtem buněk také rostla produkce polymeru. Po 23 hodinách kultivace byl růst i produkce polymeru ustálena na maximální hodnotě, nastala tedy fáze stacionární, kdy se rychlost růstu rovná rychlosti odumírání buněk. V této fázi také dochází k produkci sekundárních metabolitů, a tak je produkce PHA maximální.



Obrázek 19: Křivka závislosti turbidity a přidavku kyseliny i báze na době kultivace

Obrázek 19 znázorňuje data získaná ze softwaru příslušejícího k bioreaktoru. Data byla zaznamenávána každých 5 minut, takže můžeme získat přesnější stanovení doby jednotlivých fází růstu. Turbidimetrie měří intenzitu zákalu, je proto velmi závislá na míchání a přítomnosti bublin v měřené oblasti. Kvůli tomu mohly jednotlivé hodnoty naměřené hlavně do 4. hodiny kultivace tak silně oscilovat. Křivka znázorňující závislost turbidity na době kultivace tedy není příliš přesná, ale v podstatě opisuje křivku gravimetrického stanovení biomasy s tím, že se však hodnota ustálila pravděpodobně již ve 20. hodině. Podle závislosti přidavku báze na čas můžeme potvrdit 8. hodinu jako čas, kdy začala exponenciální fáze růstu. Ve fázi aktivního dělení je mikroorganismus již plně přizpůsoben podmínkám nového prostředí. Dochází také k aktivní tvorbě metabolických zplodin kyselého charakteru, proto se mění i hodnota pH a je potřeba přidavku báze pro opětovné získání optimálního pH pro růst. Křivka závislosti přidavku kyseliny na době kultivace ukazuje, že růst studované bakterie ustal již po 20. hodině kultivace, skončila exponenciální fáze. Následující stacionární fáze je charakterizována vyrovnanou rychlostí růstu a odumírání. Dochází k tvorbě sekundárních produktů a k uvolňování odpadních zplodin bazické povahy, které ovlivňují pH a díky tomu můžeme určit počátek této fáze pomocí závislosti přidavku kyseliny na čas.

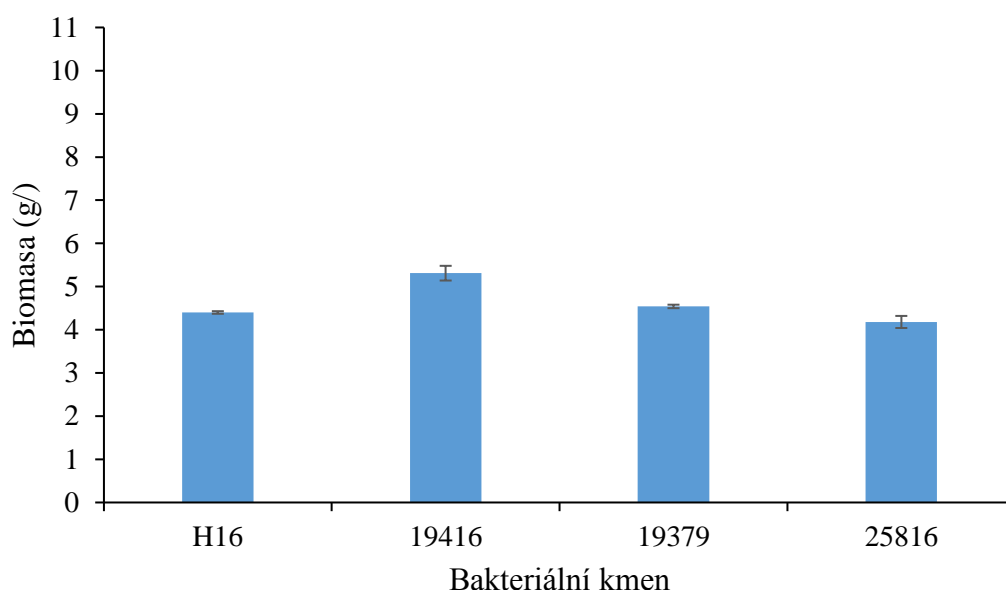


Obrázek 20: Složení PHA při kultivaci v bioreaktoru

Obrázek 20 zobrazuje složení jednotlivých polymerů produkovaných mikroorganismem *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 při kultivaci ve fermentoru v závislosti na čase. Z výsledků vidíme, že daná bakterie byla po celou dobu kultivace schopna produkovat cílený kopolymer. Od počátku kultivace do 8. hodiny, tedy do počátku exponenciální fáze, rostl molární podíl 4HB. V lag-fázi dochází k adaptaci bakterie na nové prostředí, bakterie tedy začíná využívat nový zdroj uhlíku. V tomto případě γ -butyrolakton, který je také dobrým prekurzorem pro syntézu PHA s vysokým podílem 4-hydroxybutyrátu. Tím si můžeme vysvětlit rostoucí molární podíl 4HB v kopolymeru právě v této fázi. V exponenciální fázi, vzorky odebrané v 10. a 12. hodině kultivace, byl poměr 4HB nižší než v 8. hodině a téměř totožný u obou vzorků. Snížený obsah 4-hydroxybutyrátu v polymeru mohl být způsoben právě tím, že docházelo k rychlému dělení buněk. Zdroj uhlíku byl využit k růstu, a ne jako prekurzor pro syntézu kopolymeru s vysokým obsahem 4HB. Ve stacionární fázi byl podíl 4HB v kopolymeru vůbec nejnižší, došlo k vyčerpání živin, a bakterie tak neměla vhodný prekurzor pro tvorbu monomeru 4-hydroxybutyrátu, proto docházelo spíše ke tvorbě 3-hydroxybutyrátu.

4.5 Dvoustupňová kultivace za účelem produkce P(3HB-co-4HB)

Cílem této dvoustupňové kultivace bylo v prvním kroku získat co nejvyšší množství biomasy za využití levného zdroje uhlíku, čímž by se snížily celkové náklady. A v druhém kroku využít získanou biomasu k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) za přídavku prekursoru. Pro tento experiment byly použity jednotlivé kmeny bakteriálního druhu *Cupriavidus malaysiensis* a jako kmen kontrolní byl použit kmen *Cupriavidus necator* H16. V prvním kroku kultivace probíhal růst bakterií za využití fruktosy po dobu 30 hod. Na tomto substrátu rostly námi studované bakteriální kmeny vůbec nejlépe, viz kapitola 4.2.1. Po 30hodinové kultivaci byla biomasa stočena a převedena do nového média se sníženým obsahem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, došlo tak k limitaci dusíkem za účelem iniciace syntézy PHA. Jako zdroj uhlíku byl využit 1,4-butandiol o koncentraci 8 g/l.



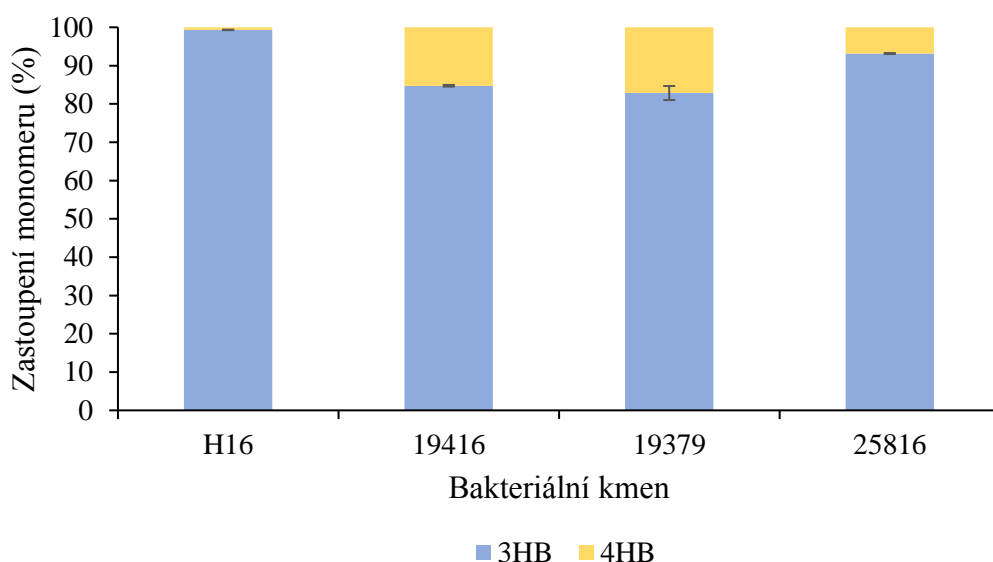
Obrázek 21: Gravimetrické stanovení biomasy (dvoustupňová kultivace)

Graf zobrazený na obrázku výše (obrázek 21) znázorňuje výsledky gravimetrického stanovení při dvoustupňové kultivaci. Z obrázku vidíme, že rozdíly v růstu nejsou u jednotlivých kmenů příliš výrazné. Nejvýznamnějšího růstu však dosáhl kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, kdež to kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 rostl naopak nejméně. Ani u jednoho bakteriálního kmene nebylo dosaženo takového zisku biomasy jako za využití fruktosy samostatně. To mohlo být způsobeno kratším časem kultivace. Všechny bakteriální kmeny však dosáhly významného růstu.

Tabulka 7: Stanovení obsahu a složení PHA (dvoustupňová kultivace)

Kmen	Biomasa (g/l)	PHA (% _{hm.})	PHA (g/l)	4HB (% _{mol.})	3HB (% _{mol.})
H16	4,40 ± 0,03	49,44 ± 0,05	2,17 ± 0,19	0,67 ± 0,06	99,33 ± 0,06
19416	5,31 ± 0,17	80,36 ± 0,01	4,27 ± 0,01	15,26 ± 0,22	84,74 ± 0,22
19379	4,54 ± 0,04	80,40 ± 0,01	3,65 ± 0,11	17,16 ± 1,83	82,84 ± 1,83
25816	4,18 ± 0,14	77,20 ± 0,01	3,23 ± 0,06	6,85 ± 0,13	93,15 ± 0,13

Tabulka 7 znázorňuje výsledky plynové chromatografie vzorků získaných při dvoustupňové kultivaci. Bakteriální kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 dosáhl nejlepšího výsledku, zisk PHA činil $4,27 \pm 0,01$ g/l. Složení tohoto polymeru bylo $84,74 \pm 0,22$ mol. % 3-hydroxybutyrátu a $15,26 \pm 0,22$ mol. % 4-hydroxybutyrátu. Lepšího složení polymeru však bylo dosaženo u bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, kde podíl 4HB tvořil $17,16 \pm 1,83$ mol. %. I v tomto případě byla produkce polymeru vysoká, $3,65 \pm 0,11$ g/l. Nejmenší produkce polymeru s nejnižším obsahem 4-hydroxybutyrátu bylo dosaženo při produkci pomocí *Cupriavidus necator* H16. Zisk PHA činil $2,17 \pm 0,19$ g/l o složení $99,33 \pm 0,06$ mol. % 3HB a $0,67 \pm 0,06$ mol. % 4HB. Bakterie *Cupriavidus necator* H16 tedy téměř nebyla schopna syntézy monomeru 4HB zakorporovaného do kopolymeru P(3HB-co-4HB). S ohledem na příznivé výsledky získané při produkci kopolymeru bakteriálními kmeny *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 a 19379 by využití dvoustupňové kultivace u těchto bakteriálních kmenů mohlo vést ke snížení nákladů na produkci kýženého kopolymeru.

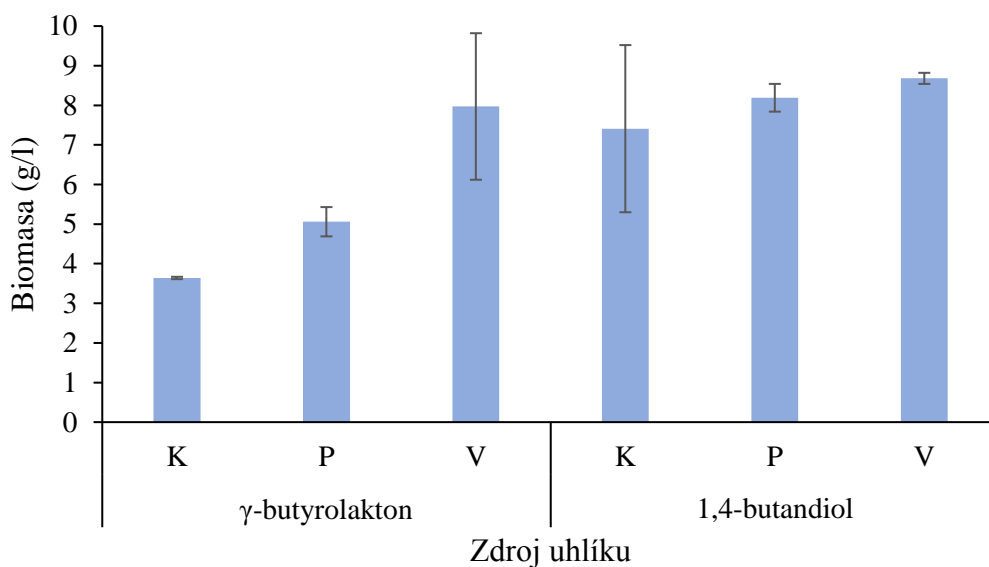


Obrázek 22: Složení PHA (dvoustupňová kultivace)

4.6 Produkce terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV)

4.6.1 Produkce za využití 1,4-butandiolu a γ -butyrolaktonu v kombinaci s kyselinou valerovou či propionátem sodným

Pro produkci terpolymeru byl vybrán kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, jelikož v předchozích experimentech dosahoval nejlepších výsledků. Jako zdroje uhlíku byly vybrány 1,4-butandiol a γ -butyrolakton, protože tyto prekurzory umí daná bakterie využít nejen k dobrému růstu, ale také k dobré produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB). Prekurzory pro syntézu monomeru 3-hydroxyvalerátu (3HV) zakorporovaného do terpolymeru zvolené pro tento experiment jsou propionát sodný a kyselina valerová. Jako kontrolu jsme zvolili kultivaci bez přidání prekurzorů 3-hydroxyvalerátu. Kultivace probíhala ve 250ml Erlenmeyerových baňkách s objemem média 100 ml, kdy byly nejdříve přidány 1,4-butandiol, respektive γ -butyrolakton, a po 24hodinové kultivaci dané prekurzory 3HV. Celková kultivace probíhala 72 hodin.



Obrázek 23: Gravimetrické stanovení biomasy (terpolymer)
K: kontrola, P: propionát sodný, V: kyselina valerová

Tabulka 8: Gravimetrické stanovení biomasy (terpolymer)

Prekurzory		Biomasa (g/l)
γ -butyrolakton	Kontrola	3,64 ± 0,03
	Propionát sodný	5,06 ± 0,37
	Kyselina valerová	7,97 ± 1,85
1,4-butandiol	Kontrola	7,41 ± 2,11
	Propionát sodný	8,19 ± 0,35
	Kyselina valerová	8,68 ± 0,14

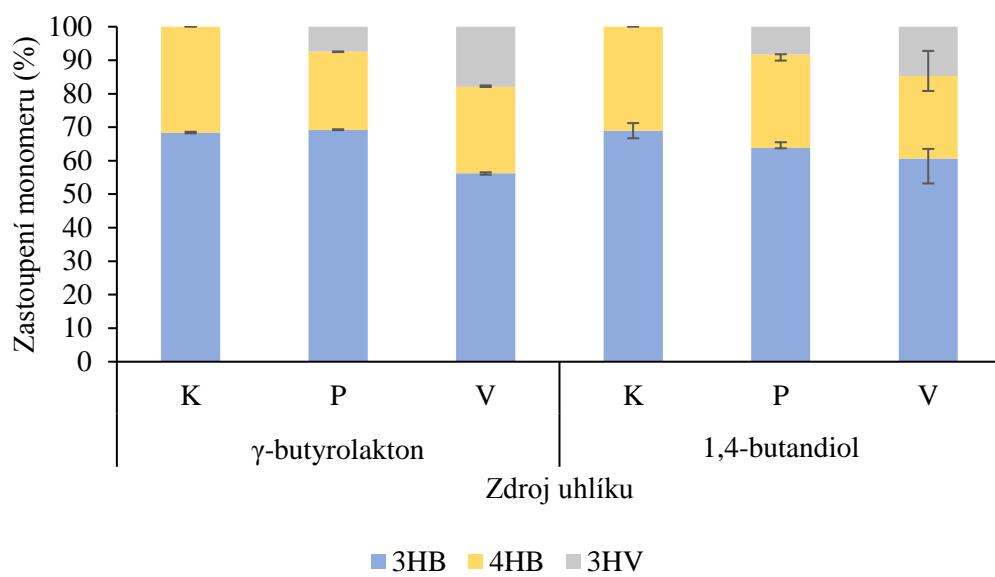
Z výsledného grafu vidíme, že bylo obecně dosaženo lepšího růstu za využití 1,4-butadiolu jako zdroje uhlíku než za využití γ -butyrolaktonu. Produkce biomasy pouze s uvedenými zdroji uhlíku byla nejnižší, a to $3,64 \pm 0,03$ g/l s využitím γ -butyrolaktonu a $7,41 \pm 2,11$ g/l s využitím

1,4-butandiolu, což je více než dvojnásobná hodnota. S přidáním prekurzorů pro syntézu terpolymeru byl zisk biomasy vyšší. Co se týče jednotlivých prekurzorů pro produkci terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV) se jako lepší jeví kyselina valerová. S přidavkem tohoto prekurzoru bylo dosaženo významného růstu jak za využití γ -butyrolaktonu, tak za využití 1,4-butandiolu. Vůbec nejvyšší koncentrace biomasy byla získána s využitím 1,4-butandiolu v kombinaci s kyselinou valerovou, zisk biomasy činil $8,68 \pm 0,14$ g/l. Tato kombinace je tedy pro růst *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 a produkci terpolymeru nejvhodnější.

*Tabulka 9: Stanovení obsahu a složení PHA (terpolymer)
K: kontrola, P: propionát sodný, V: kyselina valerová*

Prekurzory		PHA (g/l)	PHA (% _{hm.})	3HB (% _{mol.})	4HB (% _{mol.})	3HV (% _{mol.})
γ -butyrolakton	K	$0,81 \pm 0,05$	$22,14 \pm 0,01$	$68,40 \pm 0,23$	$31,60 \pm 0,23$	0
	P	$0,62 \pm 0,06$	$12,16 \pm 0,01$	$69,18 \pm 0,22$	$23,41 \pm 0,05$	$7,41 \pm 0,16$
	V	$0,82 \pm 0,09$	$10,41 \pm 0,01$	$56,22 \pm 0,32$	$25,85 \pm 0,40$	$17,92 \pm 0,07$
1,4-butandiol	K	$1,05 \pm 0,19$	$14,44 \pm 0,02$	$68,97 \pm 2,26$	$31,03 \pm 2,26$	0
	P	$1,65 \pm 0,43$	$20,01 \pm 0,04$	$63,81 \pm 1,71$	$27,87 \pm 0,10$	$8,32 \pm 1,80$
	V	$1,79 \pm 0,88$	$20,52 \pm 0,10$	$60,63 \pm 2,90$	$24,72 \pm 7,42$	$14,65 \pm 4,53$

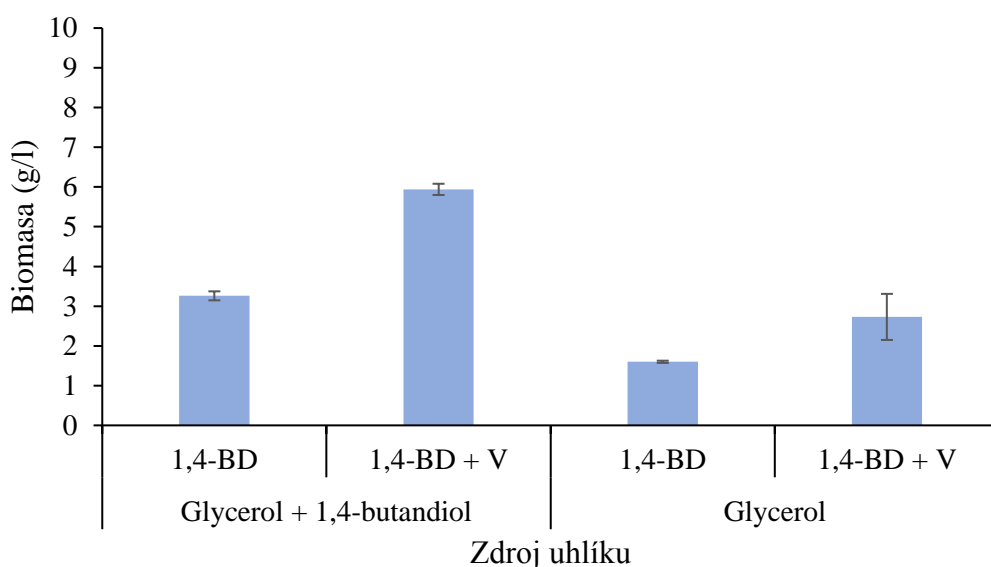
Tabulka 9 zobrazuje výsledky plynové chromatografie pro stanovení obsahu a složení PHA při kultivaci s využitím γ -butyrolaktonu či 1,4-butandiolu a příslušného prekurzoru 3HV, propionátu sodného či kyseliny valerové. U γ -butyrolaktonu i 1,4-butandiolu bylo nejvyšší produkce PHA dosaženo v kombinaci s kyselinou valerovou. V prvním případě byl zisk PHA $0,82 \pm 0,09$ g/l, v druhém případě $1,79 \pm 0,88$ g/l. Kombinace 1,4-butandiolu s kyselinou valerovou se tedy opět jeví jako nejlepší. Co se týče složení polymerů získaných při tomto experimentu, viz obrázek 24, došlo k syntéze terpolymeru za využití obou prekurzorů 3-hydroxyvalerátu. Vyšší podíl 3HV však byl získán za využití kyseliny valerové. V případě složení terpolymeru, bylo nejlepšího výsledku dosaženo za využití γ -butyrolaktonu společně s kyselinou valerovou. Složení polymeru bylo následující $56,22 \pm 0,32$ mol. % 3HB, $25,85 \pm 0,40$ mol. % 4HB a $17,92 \pm 0,07$ mol. % 3HV. Polymer produkovaný bakterií *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 za využití 1,4-butandiolu v kombinaci s kyselinou valerovou měl téměř shodné složení. Nejlepší kombinací pro produkci kýženého terpolymeru se tedy jeví 1,4-butandiol s kyselinou valerovou, kdy došlo k vysoké produkci PHA s velmi dobrým složením.



Obrázek 24: Složení PHA (terpolymer)
K:kontrola, P: propionát sodný, V: valerát

4.6.2 Dvoustupňová kultivace za účelem produkce terpolymeru

V tomto experimentu byl opět použit kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. První krok kultivace probíhal za využití glycerolu jako zdroje uhlíku. Cílem tohoto experimentu bylo vyprodukovat biomasu za využití výše uvedeného levného zdroje uhlíku, kdy byla biomasa následně využita k produkci cíleného terpolymeru. Jako prekurzor syntézy PHA s podílem 3HV byla dle výsledků předchozího experimentu vybrána kyselina valerová. Ke dvoustupňové kultivaci byl nejdříve použit buďto pouze glycerol o koncentraci 20 g/l nebo kombinace 12 g/l glycerolu s 1,4-butandiolem o koncentraci 8 g/l. Po 48hodinové kultivaci s využitím těchto substrátů byly biomasy zcentrifugovány. Zcentrifugované biomasy byly převedeny do nových minerálních médií, do kterých bylo přidáno 8 g/l 1,4-butandiolu a kyselina valerová o koncentraci 1 g/l. Kultivace poté probíhala dalších 48 hodin. Tento experiment byl proveden také bez přidání kyseliny valerové v druhém kroku.



Obrázek 25: Gravimetrické stanovení biomasy (terpolymer, dvoustupňová kultivace)

Tabulka 10: Gravimetrické stanovení biomasy (terpolymer, dvoustupňová kultivace)

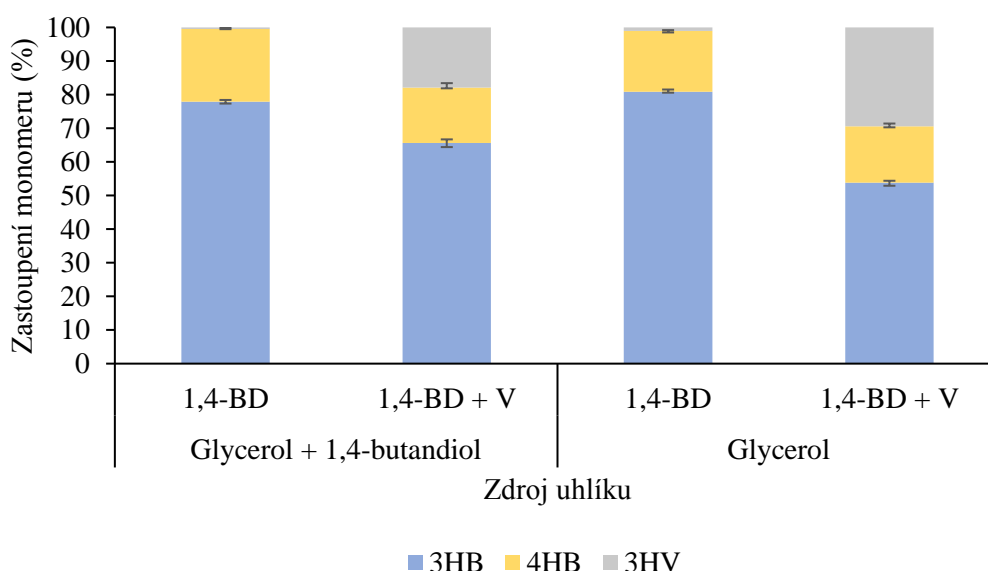
Prekurzory		Biomasa (g/l)
Glycerol, 1,4-butandiol	1,4-butandiol	3,26 ± 0,11
	1,4-butandiol + kys. valerová	5,94 ± 0,14
Glycerol	1,4-butandiol	1,60 ± 0,03
	1,4-butandiol + kys. valerová	2,73 ± 0,58

Z výsledků tohoto experimentu znázorněných výše (obrázek 25, tabulka 10) vidíme, že námi vybraný bakteriální kmen rostl nejlépe, když v prvním kroku byl použit glycerol v kombinaci s 1,4-butandiolem a v druhém 1,4-butandiol s kyselinou valerovou. Zisk biomasy činil $5,94 \pm 0,14$ g/l. Nejmenšího růstu bylo naopak dosaženo při kultivaci s využitím glycerolu a následně 1,4-butandiolu, kdy bylo získáno $1,60 \pm 0,03$ g/l biomasy.

Tabulka 11: Složení polymeru (terpolymer, dvoustupňová kultivace),
A: 1,4-butandiol, B: 1,4-butandiol + kyselina valerová

Prekurzory		PHA (g/l)	PHA (% _{hm.})	3HB (% _{mol.})	4HB (% _{mol.})	3HV (% _{mol.})
Glycerol, 1,4-butandiol	A	2,09 ± 0,01	64,14 ± 2,38	77,89 ± 0,53	21,60 ± 0,54	0,51 ± 0,01
	B	4,14 ± 0,05	69,64 ± 0,73	65,68 ± 1,02	16,46 ± 1,28	17,86 ± 0,26
Glycerol	A	0,84 ± 0,02	52,25 ± 0,12	80,85 ± 0,68	18,09 ± 0,26	1,06 ± 0,43
	B	1,42 ± 0,25	52,12 ± 1,76	53,78 ± 0,61	16,76 ± 0,87	29,46 ± 0,26

Výsledky plynové chromatografie provedené za účelem analýzy obsahu a složení PHA ukazuje tabulka 11. Z výsledků je zřejmé, že *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 je schopen syntézy kýženého terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV) při všech studovaných možnostech kultivace. Nejvyššího hmotnostního podílu, $69,64 \pm 0,73$ hm. %, a také nejvyššího zisku PHA, $4,14 \pm 0,05$ g/l, bylo dosaženo, když v prvním kroku kultivace byl použit glycerol společně s 1,4-butandiolem a v druhém 1,4-butandiol s kyselinou valerovou. Co se týče složení polymeru, bylo dobrých výsledků dosaženo, když v druhém kroku byl využit 1,4-butandiol v kombinaci s kyselinou valerovou. Když byl v prvním kroku využit pouze glycerol, získali jsme polymeru o složení $53,78 \pm 0,61$ mol. % 3HB, $16,76 \pm 0,87$ mol. % 4HB a $29,46 \pm 0,26$ mol. % 3HV. Za využití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku byl následně získán polymeru s obsahem 3HB $65,68 \pm 1,02$ mol. %, 4HB $16,46 \pm 1,28$ mol. %, 3HV $17,86 \pm 0,26$ mol. %. Oba tyto výsledky jsou velmi dobré. Celkově tedy usuzujeme, že nejvhodnější kombinací pro růst bakteriálního kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 a produkci terpolymeru o vhodném složení je využití glycerolu společně s 1,4-butandiolem v prvním kroku a v druhém kroku 1,4-butandiolu v kombinaci s kyselinou valerovou.



Obrázek 26: Složení PHA (terpolymer, dvoustupňová kultivace)

4.7 Charakterizace izolovaných polymerů

Pro další charakterizaci byly vybrány vzorky polymeru získané při kultivaci pro studium vlivu přítomnosti kyslíku a také polymer získaný při kultivaci ve fermentoru. Vzorek byl odebrán na konci kultivace, a to ve 24,5 hod. Dále byly zkoumány také polymery získané při dvoustupňové kultivaci za účelem zisku kopolymeru P(3HB-co-4HB) a všechny vzorky získané při kultivacích za účelem produkce terpolymeru. Vzorky byly izolovány dle postupu uvedeného v kapitole 3.8.1. Vyizolované polymery byly dále studovány pomocí analýzy SEC-MALS. U vybraných vzorků byly provedeny také termické analýzy.

4.7.1 SEC-MALS

Izolované polymery byly charakterizovány pomocí metody SEC-MALS. U této metody roztok makromolekul nejdříve prochází chromatografickým systémem, velikostně vylučovací chromatografií (Size Exclusion Chromatography – SEC), a poté je analyzován detektorem statického rozptylu světla ve více úhlech (Multi-Angle Light Scattering – MALS). Pomocí této analýzy byly stanoveny jak hmotnostně střední molekulové hmotnosti (M_w), číselně střední molekulové hmotnosti (M_n), tak index polydisperzity (PDI) získaný poměrem M_w ku M_n . Hmotnostně střední molekulová hmotnost představuje průměrnou molekulovou hmotnost polymeru vypočtenou z molekulové hmotnosti jednotlivých makromolekul. Číselně střední molekulová hmotnost je průměrná molekulová hmotnost polymeru vypočítaná z hmotnosti vzorku a počtu makromolekul v něm obsažených.

Tabulka 12: Výsledná tabulka analýzy SEC-MALS P(3HB-co-4HB)

Kmen	Vzorek	M_w (kDa)	M_n (kDa)	PDI (-)
19416	50 ml	$55,53 \pm 1,53$	$44,03 \pm 1,07$	$1,26 \pm 0,03$
	100 ml	$207,72 \pm 3,10$	$200,96 \pm 3,07$	$1,03 \pm 0,01$
	150 ml	$64,10 \pm 0,84$	$54,57 \pm 1,84$	$1,18 \pm 0,03$
19379	50 ml	$49,1 \pm 4,91$	$38,31 \pm 4,51$	$1,28 \pm 0,02$
	100 ml	$219 \pm 5,67$	$211,96 \pm 6,44$	$1,03 \pm 0,01$
	150 ml	$75,66 \pm 1,35$	$62,90 \pm 0,33$	$1,20 \pm 0,02$
25816	50 ml	$52,02 \pm 1,78$	$40,99 \pm 1,86$	$1,27 \pm 0,01$
	100 ml	$243,07 \pm 5,88$	$237,32 \pm 7,08$	$1,02 \pm 0,01$
	150 ml	$74,92 \pm 1,51$	$68,27 \pm 5,23$	$1,10 \pm 0,07$
19379	Fermentor	$132,54 \pm 10,82$	$119,42 \pm 8,98$	$1,11 \pm 0,01$
H16	Fruktosa + 1,4-butandiol	$155,97 \pm 5,37$	$147,19 \pm 5,64$	$1,06 \pm 0,01$
19416		$242,80 \pm 7,65$	$234,10 \pm 9,92$	$1,03 \pm 0,01$
19379		$250,00 \pm 8,50$	$242,45 \pm 7,13$	$1,04 \pm 0,01$
25816		$158,19 \pm 2,89$	$150,90 \pm 2,12$	$1,04 \pm 0,01$

Co se týče kultivace s různým obsahem kyslíku bylo nejvyšší číselně i hmotnostně střední molekulové hmotnosti dosaženo u kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 při kultivaci v minerálním médiu o objemu 100 ml ve 250ml Erlenmeyerově baňce, M_w byla stanovena na $243,07 \pm 5,88$ kDa a M_n na $237,32 \pm 7,08$ kDa. U všech kmenů bylo dosaženo nejvyšší číselně střední molekulové hmotnosti i hmotnostně střední molekulové hmotnosti při kultivaci

v médiu o objemu 100 ml, hmotnosti vždy přesahovaly 200 kDa. O poznání nižší střední molekulové hmotnosti byly naměřeny při kultivaci v médiu o objemu 50 ml i 150 ml, kdy v případě 50 ml byly molekulové hmotnosti vůbec nejnižší, a to u všech studovaných kmenů.

Polydisperzita ukazuje na nestejnorodost systému makromolekul z hlediska jejich velikosti, délky řetězce. Pokud se index polydisperzity rovná jedné, jedná se o monodisperzní systém. S rostoucí polydisperzitou systémů roste i koeficient polydisperzity. Z výsledků analýzy SEC-MALS vidíme, že PDI je blízka jedné při kultivaci v médiu o objemu 100 ml, což je u bakterií vcelku neobvyklé. Mikroorganismy obecně produkují polymery se širokou škálou molekulových hmotností, není totiž znám takový způsob regulace syntézy, který by ovlivňoval i délku řetězce. To potvrzují výsledky všech ostatních stanovovaných polymerů.

Při kultivaci ve fermentoru byl získán řetězec s číselně střední molekulovou hmotností $119,42 \pm 8,98$ kDa a hmotnostně střední molekulovou hmotností $132,54 \pm 10,82$ kDa. Polydisperzita byla stanovena na $1,11 \pm 0,01$, což značí nestejnorodost syntetizovaných polymerů. Vyšší délky řetězce by teoreticky mohlo být dosaženo prodloužením kultivace. Další možnosti pro získání delšího řetězce by mohlo být také to, že by do bioreaktoru nebylo zaočkováno inokulum kultivované pouze 24 hodin v médiu Nutrint Broth, ale inokulum kultivované 48 hodin, kdy by po 24 hodinách bylo k Nutrient Broth médiu přidáno také 8 g/l γ -butyrolaktonu, tak aby se na něj mikroorganismus již adaptoval. Při kultivaci ve fermentoru by se tak zkrátila lag fáze a dříve by došlo k vyšší produkci kopolymeru.

Co se týče dvoustupňové kultivace, kdy v prvním kroku docházelo k růstu mikroorganismů za využití fruktosy jako zdroje uhlíku a v druhém kroku docházelo k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB) za využití 1,4-butandiolu, bylo nejvyšší středně číselně i hmotnostně molekulové hmotnosti dosaženo u kmene *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Číselně střední molekulová hmotnost byla stanovena na $242,45 \pm 7,13$ kDa a hmotnostně střední molekulová hmotnost na $250,00 \pm 8,50$ kDa. Polydisperzita pak byla stanovena na $1,03 \pm 0,01$, což je velmi dobrý výsledek. Dvoustupňová kultivace u kmenů *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 i 19416 vedla k tvorbě delších řetězců než při jednostupňové kultivaci. S ohledem na složení získaných polymerů i délku řetězců je v těchto případech dvoustupňová kultivace tedy výhodnější.

Tabulka 13: Výsledná tabulka analýzy SEC-MALS *P(3HB-co-4HB-co-3HV)*
K: kontrola, P: propionát sodný, V: kyselina valerová

Kmen	Vzorek	M _w (kDa)	M _n (kDa)	PDI (-)
19379	γ-butyrolakton (K)	228,61 ± 5,43	223,52 ± 3,55	1,03 ± 0,01
	γ-butyrolakton (P)	258,98 ± 6,08	252,60 ± 9,75	1,03 ± 0,01
	γ-butyrolakton (V)	224,41 ± 10,13	210,67 ± 2,90	1,04 ± 0,01
	1,4-butandiol (K)	249,90 ± 11,26	239,06 ± 1,29	1,02 ± 0,01
	1,4-butandiol (P)	314,60 ± 12,75	313,78 ± 18,69	1,01 ± 0,01
	1,4-butandiol (V)	258,66 ± 9,61	247,30 ± 4,16	1,02 ± 0,01
19379	Glycerol + 1,4-butandiol	207,92 ± 15,44	179,14 ± 10,65	1,16 ± 0,05
	Glycerol + 1,4-butandiol (V)	190,53 ± 2,17	166,99 ± 2,78	1,14 ± 0,01
	Glycerol	175,26 ± 7,11	151,79 ± 4,41	1,15 ± 0,01
	Glycerol (V)	137,89 ± 4,34	118,16 ± 3,36	1,17 ± 0,05

Tabulka 13 zobrazuje výsledky SEC-MALS analýzy terpolymeru *P(3HB-co-4HB-co-3HV)*. Z výsledné tabulky vidíme, že první experiment za využití γ-butyrolaktonu či 1,4-butandiolu vedl ke tvorbě polymerů s vyšší číselně i hmotnostně střední molekulovou hmotností než druhý experiment s využitím glycerolu. Při porovnání využití γ-butyrolaktonu a 1,4-butandiolu bylo dosaženo vyšší M_w i M_n při využití druhého zmíněného zdroje uhlíku. Vůbec nejlepších hodnot bylo dosaženo za využití 1,4-butandiolu v kombinaci s propionátem sodným, hmotnostně středně molekulová hmotnost byla stanovena na 314,60 ± 12,75 kDa, číselně středně molekulová hmotnost na 313,78 ± 18,69 kDa. Za využití glycerolu v kombinaci s kyselinou valerovou byly hmotnosti číselně i hmotnostně středně molekulové nejnižší. M_w dosahovala hodnoty 137,89 ± 4,34 kDa, M_n 118,16 ± 3,36 kDa.

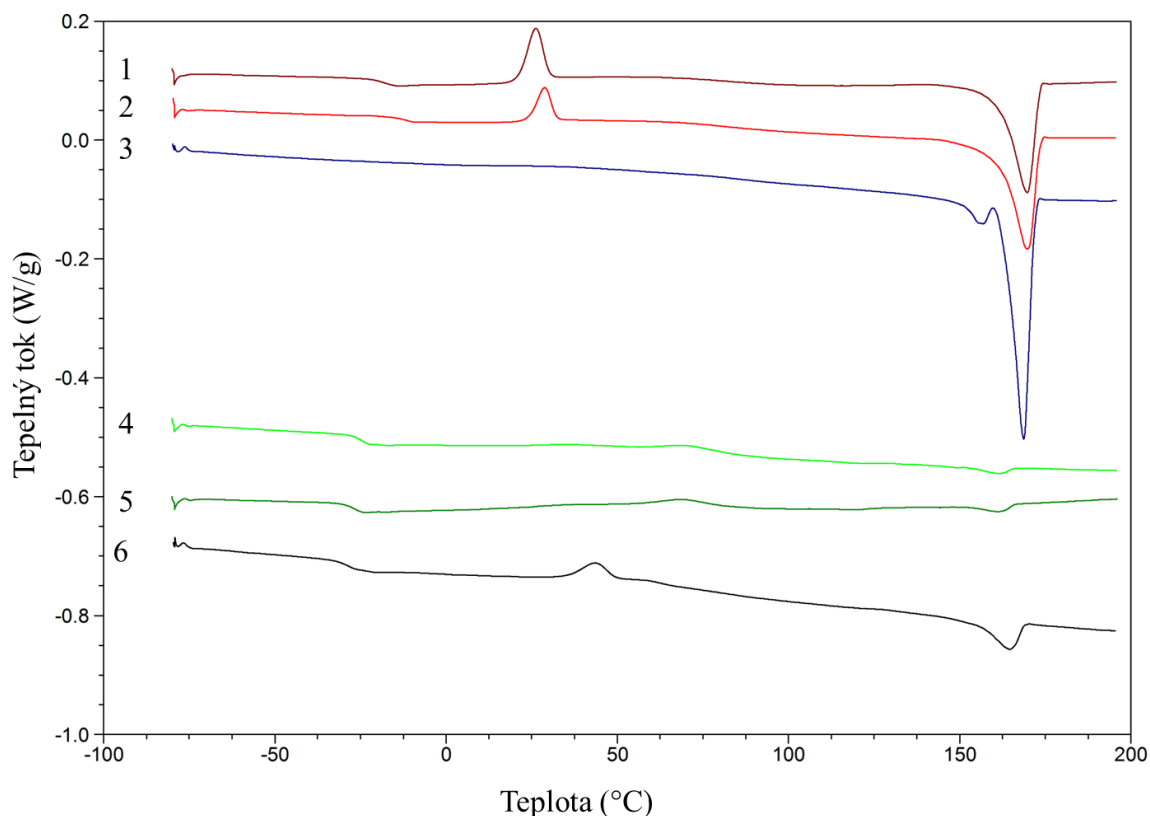
Nejnižšího koeficientu polydisperzity bylo dosaženo za využití 1,4-butandiolu, zde se hodnoty PDI pohybovaly velmi blízko jedné, což značí velmi sourodý systém. Nepatrně vyšší index polydisperzity byl určen při využití γ-butyrolaktonu jako zdroje uhlíku, hodnoty byly opět velmi blízké jedné. O poznání vyšší hodnoty indexu polydisperzity byly získány při analýze terpolymerů produkovaných za využití glycerolu, u všech studovaných polymerů se koeficient polydisperzity pohyboval okolo 1,15. Tato hodnota již předvídá nesourodost systému.

Z výsledků této analýzy tedy usuzujeme, že pro získání terpolymeru s vysokou hmotnostně středně molekulovou hmotností i číselně středně molekulovou hmotností a nízkou polydisperzitou je vhodné kultivace, kdy jako zdroj uhlíku bude použit buďto 1,4-butandiol nebo γ-butyrolakton a po 24 hodinách kultivace bude přidána kyselina valerová či propionát sodný.

4.7.2 Termické analýzy

Pro studium termických vlastností polymerů byly vybrány metody diferenciální skenovací kalorimetrie a termická gravimetrie. Pro analýzu byly vybrány následující vzorky izolovaných polymerů. Prvními vybranými vzorky byly vzorky získané při dvoustupňové kultivaci za účelem zisku kopolymeru P(3HB-co-4HB), kdy v prvním kroku byla využita fruktosa a v druhém 1,4-butandiol. Vybrané vzorky byly izolované z produkce kmenů *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 (vzorek č. 1) *Cupriavidus malaysiensis* DSM 25816 (vzorek č. 2) a také *Cupriavidus necator* H16 (vzorek č. 3). Jednotlivé polymery byly vybrány kvůli jejich složení. Kdy první vzorek obsahoval nejvyšší podíl 4HB, naopak 3. vzorek podíl nejnižší. Díky této analýze jsme mohli pozorovat změny materiálových vlastností v závislosti na složení polymeru. Ze stejných důvodů byly vybrány také vzorky terpolymeru č. 4, 5 a 6, které se ale lišily zejména obsahem 3HV. Vzorek č.4 byl odebrán za kultivace s využitím kombinace 1,4-butandiolu a kyseliny valerové, podíl 3-hydroxyvalerátu v tomto vzorku činil 14,65 mol. %. Vzorek č.5 byl získán z kultivace s využitím 1,4-butandiolu a propionátu sodného, podíl 3HV byl 8,32 mol. %. Poslední vzorek byl izolován z buněčné suspenze kultivované za účelem produkce terpolymeru, kdy byl využit glycerol a následně 1,4-butandiol společně s kyselinou valerovou. U tohoto vzorku byl molární podíl 3HV vůbec nejvyšší, a to 29,46 mol. %.

Pomocí diferenciální skenovací kalorimetrie jsme získali hodnoty teploty skelného přechodu (T_g), teploty tání (T_m). Bylo stanoveno také celkové reakční teplo nutné k fázové přeměně, ΔH . S využitím termogravimetrie byla stanovena teplota počátku degradace ($T_{d\text{onset}}$) i teplota degradace ($T_{d\text{peak}}$).



Obrázek 27: Výsledky DSC analýzy izolovaných polymerů

Tabulka 14: Výsledky termických analýz izolovaných polymerů

Vzorek	3HB (%mol.)	4HB (%mol.)	3HV (%mol.)	Mw (kDa)	PDI (-)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH (J/g)	Td _{onset} (°C)	Td _{peak} (°C)
1	84,74	15,26	0	250,00	1,04	-17,80	169,74	45,91	272,20	296,65
2	93,15	6,85	0	158,19	1,01	-11,32	169,73	51,61	271,12	293,87
3	99,33	0,67	0	155,97	1,04	-	155,79 168,70	4,70 64,89	271,88	287,94
4	60,63	24,72	14,65	258,66	1,02	-24,78	161,34	2,80	271,48	293,49
5	63,81	27,87	8,32	314,60	1,01	-26,19	161,67	3,04	275,24	300,83
6	53,78	16,76	29,46	137,89	1,17	-29,00	164,63	12,69	271,36	295,53

Z výsledků diferenciálně skenovací kalorimetrie byly stanoveny následující termické vlastnosti izolovaných polymerů. U vzorků č. 1 i 2 vidíme v oblasti teplot asi $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$ velmi malý pík značící teplotu skelného přechodu. V oblasti skelného přechodu přechází amorfni polymery při zahřívání ze skelného stavu do stavu kaučukovitého. V oblasti teplot $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ až $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ poté vidíme pík směřující vzhůru, značící studenou krystalizaci. V tomto bodě dochází ke změně amorfních struktur v krystalky. Jedná se o rekrystalizaci, exotermní děj. Charakter materiálu prvních dvou vzorků je velmi podobný i přes jiný obsah 4HB. Píky u prvních 3 vzorků mají významný pík v oblasti teploty cca $170\text{ }^{\circ}\text{C}$, typický pro polyhydroxybutyrát. Tento pík značí teplotu tání, kdy dochází k tání krystalických sturktur. Jedná se o endotermní reakci, pík směřuje dolů. Plocha píků odpovídá teplu uvolněnému při tomto ději. Výška píku je poté úměrná tepelnému toku. U třetího vzorku má pík mnohem větší plochu než u vzorku 1 i 2, to znamená, že k tvorbě taveniny je potřeba dodat větší množství tepla. Vzorky 1 a 2 mají amorfnější strukturu. O tom, že má vzorek č. 3 krystalickou strukturu vypovídá také to, že z grafu není možné odečíst hodnoty teploty skelného přechodu ani studené krystalizace typické pro amorfni polymery. Třetí vzorek se naopak vyznačuje dvojitym píkem v oblasti teploty tání, což značí, že se ve vzorku nacházel polymer ve dvou formách. Co se týče vzorků terpolymeru, jde na první pohled vidět, že na křivkách není znázorněn žádný významný pík. Jsou však znázorněny nepatrné píky pro teplotu skelného přechodu, studené krystalizace i teplotu tání. To znamená, že přidavek dalšího monomeru do struktury kopolymeru vedl k více amorfni struktuře. Zakorporování 3HV do struktury polymeru zapříčinil také snížení teploty tání na hodnotu asi $161\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Z výsledků termogravimetrické analýzy byla odečtena teplota rozkladu jednotlivých polymerů. U prvních tří vzorků, tedy vzorků kopolymeru P(3HB-co-4HB), teplota degradace rostla s rostoucím podílem 4HB. Nejvyšší teploty degradace, $296,65\text{ }^{\circ}\text{C}$, tedy bylo dosaženo u vzorku č. 1, kdy podíl 4HB činil 15,26 mol. %. U izolovaných vzorků terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV) byla nejvyšší hodnota degradační teploty naměřena u vzorku č. 5 o složení 63,81 mol. % 3HB, 27,87 mol. % 4HB a 8,32 mol. % 3HV. Jedná se o vzorek s nejnižším obsahem 3HV, ale nejvyšším podílem 4HB. To vypovídá o tom, že vyšší podíl 4HB v terpolymeru vede k vyšší teplotě degradace. U tohoto vzorku také degradace započala při nejvyšší teplotě, a to $275,24\text{ }^{\circ}\text{C}$. U všech ostatních vzorků degradace započala již při nižší teplotě. Vzorek č. 5 má tedy nejvýhodnější vlastnosti z technologického hlediska, protože jeho

teplota tání byla stanovena na téměř nejnižší, a to 161,67 °C, a teplota degradace na absolutně nejvyšší 300,83 °C. Rozdíl teploty tání a teploty degradační je důležitý z hlediska zpracování. Při práci s taveninou je důležité, aby nedošlo k jejímu rozkladu.

5 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo studium produkce PHA pomocí *Cupriavidus malaysiensis*. Byly využity kmeny *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816. Jako kontrolní kmen byl využit *Cupriavidus necator* H16. Dále byla provedena základní charakterizace produkovaných polymerů.

Nejdříve byla stanovena schopnost utilizace vybraných zdrojů uhlíku pomocí mikrotitračního stanovení se spektrofotometrickým vyhodnocením s využitím přístroje ELISA. Experiment ukázal, že námi studované bakteriální kmeny jsou schopny nejlepšího růstu za využití fruktosy jako zdroje uhlíku. Naopak ostatní sacharidy nejsou dané bakterie schopny příliš dobře využít, stejně jako karboxylové kyseliny. Dalšími dobře využívanými zdroji uhlíku studovanými bakteriemi jsou 1,4-butandiol či 1,6-hexandiol.

V dalším experimentu byl studován růst a produkce polymeru v Erlenmeyerových baňkách za účelem výběru optimálního zdroje uhlíku. Růst byl hodnocen gravimetrickou metodou, produkce a složení PHA pomocí plynové chromatografie s plamenově ionizačním detektorem. Nejprve byly využity jako zdroje uhlíku γ -butyrolakton, glukosa a fruktosa. Nejvyššího růstu bylo dle předpokladů dosaženo za využití fruktosy, nejmenšího za využití glukosy. S využitím uvedených cukerných zdrojů však bakterie byla schopna produkce pouze homopolymeru P(3HB). Dobrého růstu bylo dosaženo také za využití γ -butyrolaktonu, kdy byly jednotlivé kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis* schopny i produkce cíleného kopolymeru P(3HB-co-4HB). Dále byly jako substráty pro růst a prekursor pro syntézu kýženého kopolymeru použity 1,4-butandiol, 1,6-hexandiol a ϵ -kaprolakton. Co se týče těchto zdrojů uhlíku, dosahovaly jednotlivé kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis* nejvyššího růstu i produkce PHA s vysokým podílem 4HB za využití 1,4-butandiolu, kdežto bakteriální kmen *Cupriavidus necator* H16 dokázal dobře využít pouze ϵ -kaprolakton a využít jej i k produkci kopolymeru P(3HB-co-4HB). Studován byl také růst a produkce PHA s využitím oleje. Olej jako substrát pro svůj růst dokázala využít bakterie *Cupriavidus necator* H16, jak bylo předpokládáno. Naopak bakteriální kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis* nebyly schopny dobrého růstu za využití tohoto zdroje uhlíku. Ani jedna z bakterií však nebyla schopna produkce cíleného kopolymeru. Z výsledků těchto dílčích experimentů tedy vyvozujeme, že optimálními zdroji uhlíku pro růst bakteriálních kmenů *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416, DSM 19379 a DSM 25816 jsou γ -butyrolakton a 1,4-butandiol.

Následně byl studován vliv kultivačních parametrů na produkci polymeru. Nejprve byl studován vliv obsahu kyslíku, kdy byl jako zdroj uhlíku použit γ -butyrolakton. Bylo zjištěno, že námi studované bakteriální kmeny druhu *Cupriavidus malaysiensis* jsou schopny nejlepšího růstu a nejvyšší produkce PHA ve 250ml Erlenmeyerových baňkách v objemu média 100 ml. Kontrolní kmen *Cupriavidus necator* H16 rostl nejlépe v objemu média 50 ml, ale nejvyšší produkce PHA bylo dosaženo opět v médiu o objemu 100 ml. Pro studium vlivu osmotické síly na produkci PHA byl vybrán kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379 a jako zdroj uhlíku 1,4-butandiol. Experiment ukázal, že s rostoucí osmotickou silou klesá jak produkce biomasy, tak produkce polymeru. Při nejvyšší koncentraci NaCl, 25 g/l, byl však v buňkách nejvyšší hmotnostní podíl PHA, a to více než 50 hm. %. Došlo tedy k indukci syntézy PHA. Jelikož byl

ale růst již značně inhibován vysokou osmotickou silou, nemá toto pozorování reálné biotechnologické využití.

V dalším experimentu byla provedena kultivace v bioreaktoru za účelem produkce P(3HB-co-4HB). Jako modelový kmen byl vybrán *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379, jako zdroj uhlíku byl vybrán γ -butyrolakton, který byl přidán jak na začátku, tak po 12 hodinách kultivace. Byla pozorována lag fáze, exponenciální i stacionární fáze růstu. Ve stacionární fázi růstu byl zisk biomasy asi 8 g/l. Po celou dobu kultivace docházelo k syntéze cíleného kopolymeru. K nejvyšší produkci PHA došlo podle očekávání ve stacionární fázi, kdy dochází k syntéze sekundárních metabolitů. Bylo dosaženo produkce asi 4 g/l PHA. Tento proces však vyžaduje další optimalizaci k dosažení lepších výsledků.

Dále byla provedena dvoustupňová kultivace, kdy v prvním kroku byla využita fruktosa jako zdroj uhlíku a v druhém kroku 1,4-butandiol jako prekurzor pro syntézu PHA s vysokým podílem 4HB. Z výsledků daného experimentu usuzujeme, že dvoustupňová kultivace by s využitím bakteriálních kmenů *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19416 a DSM 19379 mohla vést ke snížení nákladů při biotechnologické produkci P(3HB-co-4HB). Jelikož bylo u těchto kmenů dosaženo jak dobrého růstu, tak vysoké produkce PHA o příznivém složení a cena fruktosy je nízká.

Předposlední část byla zaměřena na produkci terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV). Pro tento experiment byl vybrán kmen *Cupriavidus malaysiensis* DSM 19379. Bylo zjištěno, že daný bakteriální kmen je schopný produkce výše uvedeného terpolymeru za všech zkoumaných podmínek. Nejdříve probíhala kultivace za využití γ -butyrolaktonu či 1,4-butandiolu jako zdroje uhlíku a prekurzoru PHA s obsahem 4HB a propionátu sodného nebo kyseliny valerové jako prekurzoru pro syntézu PHA s podílem 3HV. Výsledky ukázaly, že k nejvyšší produkci polymeru s vhodným složením vede využití kombinace 1,4-butandiolu s kyselinou valerovou. V dalším experimentu byla zkoumána dvoustupňová kultivace terpolymeru, kdy v prvním kroku byl využit buď to samotný glycerol nebo glycerol společně s 1,4-butandiolem a v druhém kroku byl využit buď 1,4-butandiol samostatně nebo v kombinaci s kyselinou valerovou. Nejlepšího růstu i produkce kýženého terpolymeru bylo dosaženo za využití glycerolu a 1,4-butandilu v prvním kroku a 1,4-butandiolu s kyselinou valerovou v kroku druhém. Dvoustupňová kultivace by opět mohla vést ke snížení nákladů na produkci polymeru, jelikož glycerol vzniká jako odpadní produkt při reesterifikaci řepkového oleje.

Nakonec byly charakterizovány vybrané vyizolované polymery metodou SEC-MALS, DSC a byla provedena termogravimetrie. Výsledky SEC-MALS ukázaly, že se pouze polymery izolované z buněčné suspenze získané při studiu vlivu obsahu kyslíku, a to konkrétně kdy objem média byl 50 ml a 150 ml, vyznačovaly menšími hodnotami číselně i hmotnostně středně molekulové hmotnosti. Všechny ostatní studované polymery dosahovaly dobrých hodnot číselně i hmotnostně středně molekulové hmotnosti. Co se týče indexu polydisperzity, výsledky nebyly příznivé u již zmiňovaných vzorků získaných z kultivací při studiu vlivu obsahu kyslíku. Vysoké polydisperzity bylo dosaženo také při dvoustupňové kultivaci za účelem zisku terpolymeru P(3HB-co-4HB-co-3HV). U ostatních vzorků se hodnota indexu polydisperzity blížila jedné. S ohledem na výsledky termických analýz můžeme říci, že vyšší obsah 4HB

v kopolyměru P(3HB-*co*-4HB) vede opravdu k vylepšení vlastností polymeru, jelikož je jeho struktura méně krystalická. Co se týče produkce terpolymeru P(3HB-*co*-4HB-*co*-3HV) bylo dosaženo ještě lepších vlastností než při zisku kopolyměru. Vůbec nejlepší vlastnosti byly stanoveny u vzorku polymeru o složení 63,81 mol. % 3HB, 27,87 mol. % 4HB a 8,32 mol. %, kdy teplota degradace byla stanovena na 300,83 °C a teplota tání na 161,67 °C. Toto zjištění má technologický význam, jelikož rozdíl teploty tání a teploty rozkladu je důležitý při zpracování, kdy se pracuje s taveninou, ale nesmí dojít k rozkladu polymeru. Takto velký rozdíl teploty tání a teploty degradace tedy předvídá dobrou zpracovatelnost získaného polymeru.

6 POUŽITÉ ZDROJE

- [1] MATHURIYA, Abhilasha Singh a J. V. YAKHMI. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics and Their Applications. MARTÍNEZ, Leticia Myriam Torres, Oxana Vasilievna KHARISSOVA a Boris Ildusovich KHARISOV, ed. *Handbook of Ecomaterials* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2017, 2017-09-21, s. 1-29 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/978-3-319-48281-1_84-1. ISBN 978-3-319-48281-1. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-48281-1_84-1
- [2] KAUR, Loveleen, Robinka KHAJURIA, Leena PARIHAR a G. Dimpal SINGH. POLYHYDROXYALKANOATES: BIOSYNTHESIS TO COMMERCIAL PRODUCTION. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences* [online]. 2017, **6**(4), 1098-1106 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.15414/jmbfs.2017.6.4.1098-1106. ISSN 13385178. Dostupné z: http://www.jmbfs.org/jmbfs-1186-kaur/?issue_id=4424&article_id=18
- [3] KYNADI, Anna a T.V. SUCHITHRA, PRAMANIK, Krishna a Jayanta Kumar PATRA, ed., 2014. Polyhydroxyalkanoates: Biodegradable Plastics for Environmental Conservation. *Industrial & Environmental Biotechnology*. s. 1-15. ISBN 978-93-80012-67-4.
- [4] MOŽEJKO-CIESIELSKA, Justyna a Robert KIEWISZ. Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous?. *Microbiological Research* [online]. 2016, **192**, 271-282 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.micres.2016.07.010. ISSN 09445013. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S094450131630043X>
- [5] PAKALAPATI, Harshini, Chih-Kai CHANG, Pau Loke SHOW, Senthil Kumar ARUMUGASAMY a John Chi-Wei LAN. Development of polyhydroxyalkanoates production from waste feedstocks and applications. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2018, **126**(3), 282-292 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2018.03.016. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172317311982>
- [6] ZHANG, Junyu, Ekaterina I. SHISHATSKAYA, Tatiana G. VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C* [online]. 2018, **86**, 144-150 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.msec.2017.12.035. ISSN 09284931. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117333325>
- [7] RAZA, Zulfiqar Ali, Sharjeel ABID a Ibrahim M. BANAT. Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2018, **126**, 45-56 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2017.10.001. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830517300276>
- [8] KOSSEVA, Maria R. a Edy RUSBANDI. Trends in the biomanufacture of polyhydroxyalkanoates with focus on downstream processing. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **107**, 762-778 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017323140>
- [9] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM a Shazia TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161-174 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813016303774>

- [10] ZHANG, Lei, Zhen-Yu SHI, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Microbial production of 4-hydroxybutyrate, poly-4-hydroxybutyrate, and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by recombinant microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00253-009-2023-7>
- [11] DOMB, A. J. a Jay Prakash JAIN. *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*. Hoboken, NJ: Wiley, 2011. ISBN 9780470424759.
- [12] LI, Zibiao, Jing YANG a Xian Jun LOH. Polyhydroxyalkanoates: opening doors for a sustainable future. *NPG Asia Materials* [online]. 2016, 8(4), e265-e265 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1038/am.2016.48. ISSN 1884-4049. Dostupné z: <http://www.nature.com/articles/am201648>
- [13] LEE, Wing-Hin, Mohd N.M. AZIZAN a Kumar SUDESH. Effects of culture conditions on the composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) synthesized by *Comamonas acidovorans*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, 84(1), 129-134 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2003.10.003. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003003549>
- [14] ZHILA, Natalia a Ekaterina SHISHATSKAYA. Properties of PHA bi-, ter-, and quarter-polymers containing 4-hydroxybutyrate monomer units. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, 111, 1019-1026 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.130. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813017318512>
- [15] CHEE, Jee-Wei, A.A. AMIRUL, T.S. TENGKU MUHAMMAD, M.I.A. MAJID a S.M. MANSOR. The influence of copolymer ratio and drug loading level on the biocompatibility of P(3HB-co-4HB) synthesized by *Cupriavidus* sp. (USMAA2-4). *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2008, 38(3), 314-318 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.bej.2007.07.018. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X07002677>
- [16] HUONG, Kai-Hee, Mat Junoh AZURAINI, Nursolehah Abdul AZIZ a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. Pilot scale production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) biopolymers with high molecular weight and elastomeric properties. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2017, 124(1), 76-83 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.02.003. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172316305060>
- [17] MARTIN, David P. a Simon F. WILLIAMS. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2003, 16(2), 97-105 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/S1369-703X(03)00040-8. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X03000408>
- [18] CHU, C.C. Materials for absorbable and nonabsorbable surgical sutures. *Biotextiles as Medical Implants* [online]. Elsevier, 2013, 2013, s. 275-334 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1533/9780857095602.2.275. ISBN 9781845694395. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845694395500119>
- [19] CHEN, Guo-Qiang a Xiao-Ran JIANG. Engineering microorganisms for improving polyhydroxyalkanoate biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2018, 53, 20-25 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.copbio.2017.10.008. ISSN 09581669. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0958166917301933>
- [20] LEE, Sang Yup. Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria. *Trends in Biotechnology* [online]. 1996, 14(11), 431-438 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/0167-7799(96)10061-5. ISSN 01677799. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0167779996100615>

- [21] TSUGE, Takeharu. Metabolic improvements and use of inexpensive carbon sources in microbial production of polyhydroxyalkanoates. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2002, **94**(6), 579-584 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/S1389-1723(02)80198-0. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172302801980>
- [22] LUENGO, José M, Belén GARCÍA, Angel SANDOVAL, Germán NAHARRO a Elías R OLIVERA. Bioplastics from microorganisms. *Current Opinion in Microbiology* [online]. 2003, **6**(3), 251-260 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/S1369-5274(03)00040-7. ISSN 13695274. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527403000407>
- [23] LI, Tian, Dina ELHADI a Guo-Qiang CHEN. Co-production of microbial polyhydroxyalkanoates with other chemicals. *Metabolic Engineering* [online]. 2017, **43**, 29-36 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2017.07.007. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717617301520>
- [24] LV, Li, Yi-Lin REN, Jin-Chun CHEN, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis. *Metabolic Engineering* [online]. 2015, **29**, 160-168 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2015.03.013. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717615000397>
- [25] DOI, Yoshiharu, Atsushi SEGAWA a Masao KUNIOKA. Biosynthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 1990, **12**(2), 106-111 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/0141-8130(90)90061-E. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/014181309090061E>
- [26] VALENTIN, Henry E a Douglas DENNIS. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in recombinant *Escherichia coli* grown on glucose. *Journal of Biotechnology* [online]. 1997, **58**(1), 33-38 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00127-2. ISSN 01681656. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165697001272>
- [27] VOLOVA, Tatiana G., Svetlana V. PRUDNIKOVA, Olga N. VINOGRADOVA, Darya A. SYRVACHEVA a Ekaterina I. SHISHATSKAYA. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates with Different Chemical Compositions and Their Biodegradability. *Microbial Ecology* [online]. 2017, **73**(2), 353-367 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/s00248-016-0852-3. ISSN 0095-3628. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00248-016-0852-3>
- [28] LEE, Sang Yup a Jong-il CHOI. Production and degradation of polyhydroxyalkanoates in waste environment. *Waste Management* [online]. 1999, **19**(2), 133-139 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/S0956-053X(99)00005-7. ISSN 0956053X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0956053X99000057>
- [29] BOYANDIN, Anatoly N., Svetlana V. PRUDNIKOVA, Valery A. KARPOV, et al. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2013, **83**, 77-84 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.04.014. ISSN 09648305. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0964830513001790>
- [30] YE, Jianwen, Dingkai HU, Xuemei CHE, Xiaoran JIANG, Teng LI, Jinchun CHEN, Haoqian M. ZHANG a Guo-Qiang CHEN. Engineering of *Halomonas bluephagenesis* for low cost production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from glucose. *Metabolic Engineering* [online]. 2018, **47**, 143-152 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.03.013. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717618300181>

- [31] PONTRELLI, Sammy, Tsan-Yu CHIU, Ethan I. LAN, Frederic Y.-H. CHEN, Peiching CHANG a James C. LIAO. Escherichia coli as a host for metabolic engineering. *Metabolic Engineering* [online]. 2018, **50**, 16-46 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2018.04.008. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717618300740>
- [32] LI, Rui, Hanxing ZHANG a Qingsheng QI. The production of polyhydroxyalkanoates in recombinant Escherichia coli. *Bioresource Technology* [online]. 2007, **98**(12), 2313-2320 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.014. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852406004718>
- [33] LEONG, Yoong Kit, Pau Loke SHOW, Chien Wei OOI, Tau Chuan LING a John Chi-Wei LAN. Current trends in polyhydroxyalkanoates (PHAs) biosynthesis: Insights from the recombinant Escherichia coli. *Journal of Biotechnology* [online]. 2014, **180**, 52-65 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.03.020. ISSN 01681656. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165614001321>
- [34] LE MEUR, Sylvaine, Manfred ZINN, Thomas EGLI, Linda THÖNY-MEYER a Qun REN. Improved productivity of poly (4-hydroxybutyrate) (P4HB) in recombinant Escherichia coli using glycerol as the growth substrate with fed-batch culture. *Microbial Cell Factories* [online]. 2014, **13**(1) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1186/s12934-014-0131-2. ISSN 1475-2859. Dostupné z: <http://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-014-0131-2>
- [35] CHEN, Guo-Qiang, Xiao-Ran JIANG a Yingying GUO. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synthetic and Systems Biotechnology* [online]. 2016, **1**(4), 236-242 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.synbio.2016.09.006. ISSN 2405805X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2405805X16300448>
- [36] WANG, Ying, Hong WU, Xiaoran JIANG a Guo-Qiang CHEN. Engineering Escherichia coli for enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in larger cellular space. *Metabolic Engineering* [online]. 2014, **25**, 183-193 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2014.07.010. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717614001013>
- [37] LI, Zheng-Jun, Zhen-Yu SHI, Jia JIAN, Ying-Ying GUO, Qiong WU a Guo-Qiang CHEN. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) from unrelated carbon sources by metabolically engineered Escherichia coli. *Metabolic Engineering* [online]. 2010, **12**(4), 352-359 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ymben.2010.03.003. ISSN 10967176. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1096717610000194>
- [38] CESÁRIO, M. Teresa, Rodrigo S. RAPOSO, M. Catarina M.D. de ALMEIDA, Frederik VAN KEULEN, Bruno S. FERREIRA, João P. TELO a M. Manuela R. da FONSECA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by Burkholderia sacchari using wheat straw hydrolysates and gamma-butyrolactone. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2014, **71**, 59-67 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2014.04.054. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813014002815>
- [39] MIRANDA DE SOUSA DIAS, Miguel, Martin KOLLER, Dario PUPPI, Andrea MORELLI, Federica CHIELLINI a Gerhart BRAUNEGG. Fed-Batch Synthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) and Poly(3-Hydroxybutyrate-co-4-Hydroxybutyrate) from Sucrose and 4-Hydroxybutyrate Precursors by Burkholderia sacchari Strain DSM 17165. *Bioengineering* [online]. 2017, **4**(4) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.3390/bioengineering4020036. ISSN 2306-5354. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2306-5354/4/2/36>

- [40] NASCIMENTO, Valkirea Matos, Luiziana Ferreira SILVA, José Gregório Cabrera GOMEZ a Gustavo Graciano FONSECA. Growth of *Burkholderia sacchari* LFM 101 cultivated in glucose, sucrose and glycerol at different temperatures. *Scientia Agricola* [online]. 2016, **73**(5), 429-433 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1590/0103-9016-2015-0196. ISSN 0103-9016. Dostupné z: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162016000500429&lng=en&tlng=en
- [41] RAPOSO, Rodrigo S., M. Catarina M.D. DE ALMEIDA, M.M.R. DA FONSECA a M. Teresa CESÁRIO. Feeding strategies for tuning poly (3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) monomeric composition and productivity using *Burkholderia sacchari*. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2017, **105**, 825-833 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.07.111. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S014181301730658X>
- [42] CHOI, Mun Hwan; YOON, Sung Chul; LENZ, Robert W. Production of poly (3-hydroxybutyric acid-co-4-hydroxybutyric acid) and poly (4-hydroxybutyric acid) without subsequent degradation by *Hydrogenophaga pseudoflava*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**.4: 1570-1577.
- [43] OBRUCA, Stanislav, Ondrej SNAJDAR, Zdenek SVOBODA a Ivana MAROVA. Application of random mutagenesis to enhance the production of polyhydroxyalkanoates by *Cupriavidus necator* H16 on waste frying oil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2013, **29**(12), 2417-2428 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/s11274-013-1410-5. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-013-1410-5>
- [44] RAO, Urmila, R. SRIDHAR a P.K. SEHGAL. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochemical Engineering Journal* [online]. 2010, **49**(1), 13-20 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.bej.2009.11.005. ISSN 1369703X. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X09003362>
- [45] CHEN, Xiangbin, Jin YIN, Jianwen YE, et al. Engineering *Halomonas bluephagenesis* TD01 for non-sterile production of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Bioresource Technology* [online]. 2017, **244**, 534-541 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.07.149. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852417312658>
- [46] YE, Jianwen, Wuzhe HUANG, Dongsheng WANG, Fengyi CHEN, Jin YIN, Teng LI, Haoqian ZHANG a Guo-Qiang CHEN. Pilot Scale-up of Poly(3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) Production by *Halomonas bluephagenesis* via Cell Growth Adapted Optimization Process. *Biotechnology Journal* [online]. 2018, **13**(5) [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1002/biot.201800074. ISSN 18606768. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/biot.201800074>
- [47] RAMACHANDRAN, Hema, Nur Asilla Hani SHAFIE, Kumar SUDESH, Mohamad Noor AZIZAN, Mohamad Isa Abdul MAJID a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. *Cupriavidus malaysiensis* sp. nov., a novel poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) accumulating bacterium isolated from the Malaysian environment. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2018, **111**(3), 361-372 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/s10482-017-0958-8. ISSN 0003-6072. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10482-017-0958-8>
- [48] SHAFIE, Nur Asilla Hani, Nyok-Sean LAU, Hema RAMACHANDRAN a Al-Ashraf Abdullah AMIRUL. Complete Genome Sequences of Three *Cupriavidus* Strains Isolated from Various Malaysian Environments. *Genome Announcements*[online]. 2017, **5**(3),

- e01498-16 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1128/genomeA.01498-16. ISSN 2169-8287. Dostupné z: <http://genomea.asm.org/lookup/doi/10.1128/genomeA.01498-16>
- [49] RAMACHANDRAN, Hema, Mohd Adnan IQBAL a A.-A. AMIRUL. Identification and Characterization of the Yellow Pigment Synthesized by *Cupriavidus* sp. USMAHM13. *Applied Biochemistry and Biotechnology* [online]. 2014, **174**(2), 461-470 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1007/s12010-014-1080-2. ISSN 0273-2289. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12010-014-1080-2>
- [50] TULI, Hardeep S., Prachi CHAUDHARY, Vikas BENIWAL a Anil K. SHARMA. Microbial pigments as natural color sources: current trends and future perspectives. *Journal of Food Science and Technology* [online]. 2015, **52**(8), 4669-4678 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.1007/s13197-014-1601-6. ISSN 0022-1155. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s13197-014-1601-6>
- [51] HAMMOND, Billy R. a Lisa M. RENZI. Carotenoids. *Advances in Nutrition* [online]. 2013, **4**(4), 474-476 [cit. 2019-04-15]. DOI: 10.3945/an.113.004028. ISSN 2156-5376. Dostupné z: <https://academic.oup.com/advances/article/4/4/474/4259634>
- [52] HUONG, Kai-Hee, K.A.R. ELINA a A.A. AMIRUL. Production of high molecular weight poly(3-hydroxybutyrate- co -4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus malaysiensis* USMAA1020 utilising substrate with longer carbon chain. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2018, **116**, 217-223 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.04.148. ISSN 01418130. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813018311929>
- [53] HUONG, Kai-Hee, Ahmad Ramli MOHD YAHYA a A.A. AMIRUL. Pronounced synergistic influence of mixed substrate cultivation on single step copolymer P(3HB- co -4HB) biosynthesis with a wide range of 4HB monomer composition. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* [online]. 2014, **89**(7), 1023-1029 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1002/jctb.4195. ISSN 02682575. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.4195>
- [54] SYAFIQ, Ishak Muhammad, Kai-Hee HUONG, K. SHANTINI, S. VIGNESWARI, Nursolehah Abd AZIZ, Al-Ashraf Abdullah AMIRUL a Kesaven BHUBALAN. Synthesis of high 4-hydroxybutyrate copolymer by *Cupriavidus* sp. transformants using one-stage cultivation and mixed precursor substrates strategy. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 2017, **98**, 1-8 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.enzmtec.2016.11.011. ISSN 01410229. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022916302447>
- [55] RAHAYU, A., Z. ZALEHA, Ahmad R. M. YAHYA, M. I. A. MAJID a A. A. AMIRUL. Production of copolymer poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) through a one-step cultivation process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2008, **24**(11), 2403-2409 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1007/s11274-008-9764-9. ISSN 0959-3993. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11274-008-9764-9>
- [56] ORITA, Izumi, Reiko IWAZAWA, Satoshi NAKAMURA a Toshiaki FUKUI. Identification of mutation points in *Cupriavidus necator* NCIMB 11599 and genetic reconstitution of glucose-utilization ability in wild strain H16 for polyhydroxyalkanoate production. *Journal of Bioscience and Bioengineering* [online]. 2012, **113**(1), 63-69 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.09.014. ISSN 13891723. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1389172311003872>
- [57] YU, Jian. Microbial Production of Bioplastics from Renewable Resources. *Bioprocessing for Value-Added Products from Renewable Resources* [online]. Elsevier, 2007, 2007, s. 585-610 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/B978-044452114-9/50024-4. ISBN 9780444521149. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444521149500244>

- [58] NAKAMURA, K. A structural study of the crystalline state of the bacterial copolyester poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate). *Polymer* [online]. 1994, **35**(1), 193-197 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/0032-3861(94)90071-X. ISSN 00323861. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/003238619490071X>
- [59] AMIRUL, A.A., A.R.M. YAHYA, K. SUDESH, M.N.M. AZIZAN a M.I.A. MAJID. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) copolymer by *Cupriavidus* sp. USMAA1020 isolated from Lake Kulim, Malaysia. *Bioresource Technology* [online]. 2008, **99**(11), 4903-4909 [cit. 2019-04-14]. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.09.040. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852407007870>
- [60] OBRUCA, Stanislav, Ivana MAROVA, Ondrej SNAJDAR, Ludmila MRAVCOVA a Zdenek SVOBODA. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Cupriavidus necator* from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters* [online]. 2010, **32**(12), 1925-1932 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1007/s10529-010-0376-8. ISSN 0141-5492. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10529-010-0376-8>
- [61] KAHAR, Prihardi, Takeharu TSUGE, Kazunori TAGUCHI a Yoshiharu DOI. High yield production of polyhydroxyalkanoates from soybean oil by *Ralstonia eutropha* and its recombinant strain. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2004, **83**(1), 79-86 [cit. 2019-04-27]. DOI: 10.1016/S0141-3910(03)00227-1. ISSN 01413910. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141391003002271>
- [62] OBRUCA, Stanislav, Petr SEDLACEK, Filip MRAVEC, et al. The presence of PHB granules in cytoplasm protects non-halophilic bacterial cells against the harmful impact of hypertonic environments. *New Biotechnology* [online]. 2017, **39**, 68-80 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.nbt.2017.07.008. ISSN 18716784. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1871678417300195>
- [63] OBRUCA, S., I. MAROVA, Z. SVOBODA a R. MIKULIKOVA. Use of controlled exogenous stress for improvement of poly(3-hydroxybutyrate) production in *Cupriavidus necator*. *Folia Microbiologica* [online]. 2010, **55**(1), 17-22 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1007/s12223-010-0003-z. ISSN 0015-5632. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s12223-010-0003-z>
- [64] PASSANHA, Pearl, Gopal KEDIA, Richard M. DINSDALE, Alan J. GUWY a Sandra R. ESTEVES. The use of NaCl addition for the improvement of polyhydroxyalkanoate production by *Cupriavidus necator*. *Bioresource Technology* [online]. 2014, **163**, 287-294 [cit. 2019-05-01]. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.04.068. ISSN 09608524. Dostupné z: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852414006087>